

**APROXIMACION GENÓMICA DE PACIENTES
COLOMBIANOS AFECTADOS POR SINDROME DE STEVENS
JOHNSON Y NECROLISIS EPIDERMICA TOXICA MEDIANTE
EL ANALISIS DEL GEN *GNLY***

OLGA PATRICIA LONDOÑO RAMIREZ

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA
DEL ROSARIO**

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C. NOVIEMBRE DE 2017

**APROXIMACION GENÓMICA DE PACIENTES
COLOMBIANOS AFECTADOS POR STEVENS JOHNSON Y
NECROLISIS EPIDERMICA TOXICA MEDIANTE EL
ANALISIS DEL GEN *GNLY***

OLGA PATRICIA LONDOÑO RAMIREZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA

DIRECTOR

DORA FONSECA MSc, PhD

CO-DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD, HDR

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA
DEL ROSARIO**

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C. NOVIEMBRE DE 2017

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Nota de Aceptación

Director

Co-Director

Jurado

Jurado

Bogotá D. C. Noviembre de 2017

A mi familia...

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por hacer todo cuanto estuvo a su alcance para ayudarme y por ser el mejor ejemplo a seguir.

Al grupo CIGGUR y al Dra. Dora Fonseca por su incondicionalidad, por su apoyo, su amor por la ciencia y su conocimiento para la realización de esta tesis.

A mis amigos de la maestría con quienes recorrí este camino.

A la universidad del Rosario por facilitar el desarrollo de este trabajo de investigación.

Tabla de contenido

| | |
|---|---------------|
| 2. Resumen | - 12 - |
| 3. Introducción | - 13 - |
| 4. Justificación..... | - 15 - |
| 5. Objetivos..... | - 17 - |
| 5.1 Objetivo General..... | - 17 - |
| 5.2 Objetivos Específicos | - 17 - |
| 6. Marco Teórico..... | - 18 - |
| 6.1 Reacciones Adversas a Medicamentos | - 18 - |
| 6.1.1 Definición..... | - 18 - |
| 6.1.2 Incidencia | - 19 - |
| 6.1.3 Clasificación de las RAM | - 23 - |
| 6.1.3.1 Reacciones de tipo A..... | - 23 - |
| 6.1.3.2 Reacciones de tipo B | - 25 - |
| 6.1.3.3 Reacciones de tipo C | - 28 - |
| 6.1.3.4 Reacciones de tipo D..... | - 29 - |
| 6.1.3.5 Reacciones de tipo E..... | - 29 - |
| 6.1.3.6 Reacciones de tipo F..... | - 30 - |
| 6.1.4 Mecanismos Inmunológicos y Genéticos de las RAM | - 31 - |
| 6.1.4.1 Mecanismos Inmunológicos de las RAM..... | - 31 - |
| 6.1.4.1.1 Sensibilización a Fármacos..... | - 31 - |
| 6.1.4.1.1.1 Concepto Hapteno | - 32 - |
| 6.1.4.1.1.2 Concepto Prohapteno | - 33 - |
| 6.1.4.1.1.3 Concepto “p-i”..... | - 34 - |
| 6.1.4.1.2 Citotoxicidad Mediada por Células | - 35 - |
| 6.1.4.1.2.1 Células Natural Killer (NK)..... | - 36 - |
| 6.1.4.1.2.1.1 Origen y Diferenciación de las Células NK | - 36 - |
| 6.1.4.1.2.1.2 Función de las Células NK..... | - 38 - |
| 6.1.4.1.2.2 Linfocitos T Citotóxicos (CTLs)..... | - 40 - |
| 6.1.4.1.2.2.1 Origen y Diferenciación de los CTLs..... | - 40 - |
| 6.1.4.1.2.2.2 Función de los CTLs | - 42 - |
| 6.1.5 Mecanismos Genéticos de las RAM | - 44 - |
| 6.1.5.1 Farmacogenética..... | - 47 - |
| 6.1.5.1.1 Farmacocinética | - 47 - |
| 6.1.5.1.2 Farmacodinamia..... | - 48 - |
| 6.1.5.2 Farmacogenómica..... | - 49 - |
| 6.1.5.3 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)..... | - 49 - |
| 6.1.5.3.1 Características Genéticas | - 50 - |
| 6.1.5.3.1.1 Genes Clase I..... | - 51 - |

| | |
|---|----------------|
| 6.1.5.3.1.2 Genes Clase II | - 52 - |
| 6.1.5.3.1.3 Genes Clase III | - 52 - |
| 6.1.5.3.2 Productos Proteicos MHC | - 53 - |
| 6.1.5.3.2.1 Moléculas MHC I..... | - 53 - |
| 6.1.5.3.2.2 Moléculas MHC II | - 54 - |
| 6.1.5.3.3 Asociación MHC y las Respuestas de Hipersensibilidad | - 56 - |
| 6.1.6 Fenotipo de las RAM cutáneas..... | - 58 - |
| 6.1.6.1 Síndrome Stevens Johson y Necrólisis Epidérmica Tóxica (SJS/NET)... | - 60 - |
| 6.1.6.1.1 Clínica..... | - 61 - |
| 6.1.6.1.2 Fisiopatología..... | - 62 - |
| 6.1.6.2 Moléculas Citotóxicas en SJS/ NET..... | - 63 - |
| 6.1.6.2.1 Proteínas Citotóxicas | - 64 - |
| 6.1.6.2.1.1 Perforina..... | - 66 - |
| 6.1.6.2.1.2 Granzima | - 67 - |
| 6.1.6.2.1.3 Granulicina | - 69 - |
| 7. Pregunta de Investigación..... | - 75 - |
| 8. Hipótesis | - 75 - |
| 9. Materiales y Métodos | - 76 - |
| 9.1 Pacientes y controles de estudio | - 76 - |
| 9.2 Amplificación y secuenciación de la región codificante del gen <i>GNLY</i> | - 77 - |
| 9.3 Amplificación y secuenciación de la región promotora del gen <i>GNLY</i> | - 79 - |
| 9.4 Identificación de sitios de fijación de factores de transcripción en la región promotora del gen <i>GNLY</i> | - 81 - |
| 10. Resultados | - 82 - |
| 10.1 Características Clínicas y Demográficas de los pacientes | - 82 - |
| 10.2 Secuenciación directa mediante Sanger de la región codificante del gen <i>GNLY</i> - | 84 - |
| 10.3 Secuenciación directa mediante Sanger de la región promotora del gen <i>GNLY</i> .. | - 87 - |
| 10.4 Identificación de sitios potenciales de unión de factores de transcripción a la región promotora del gen <i>GNLY</i> | - 89 - |
| 11. Discusión..... | - 91 - |
| 12. Conclusiones..... | - 97 - |
| 13. Perspectivas..... | - 99 - |
| 14. Anexos..... | - 100 - |
| 14.1 Anexo 1 Aprobación comité de ética de la Universidad del Rosario | - 100 - |
| 14.2 Anexo 2 Extracción de DNA Genómico (PROBE)..... | - 102 - |
| 14.3 Anexo Genomatix | - 104 - |
| 15. Bibliografía..... | - 105 - |

Figuras

| | |
|--|----|
| 1. Mecanismo de hapteno/prohapteno..... | 33 |
| 2. Concepto p-i (interacción farmacológica de drogas con receptor inmune) | 34 |
| 3. Origen y Diferenciación de las células NK y CTLs CD8+..... | 37 |
| 4. Activación de la célula NK..... | 39 |
| 5. Funciones de las células NK..... | 39 |
| 6. Superficialización de moléculas MHC I en T CD8+..... | 43 |
| 7. Localización genes HLA..... | 51 |
| 8. Región genes clase I..... | 51 |
| 9. Región genes clase II..... | 52 |
| 10. Región genes clase III..... | 52 |
| 11. Estructura moléculas MHC I-II..... | 53 |
| 12. Clasificación HLA..... | 55 |
| 13. RAM, Interacción de Sistemas Biológicos | 55 |
| 14. Espectro fenotípico de las RAM cutáneas | 59 |
| 15. Vía de exocitosis celular..... | 65 |
| 16. Mecanismo de acción de la perforina | 67 |
| 17. Activación citotóxica mediada por granzima | 68 |
| 18. Secuencia de aminoácidos proteína granulicina 15kDa..... | 70 |
| 19. Estructura de la proteína granulicina | 71 |
| 20. Actividad citotóxica de la granulicina mediada por CTLs | 72 |
| 21. Actividad citotóxica de la granulicina mediado por células NK..... | 73 |
| 22. Cromatograma exón 1 c.11G>A..... | 84 |
| 23. Cromatograma exón 4 c.356 C>T..... | 85 |
| 24. Alineamiento de secuencias del gen <i>GNLY</i> en diferentes especies..... | 85 |
| 25. Análisis <i>In Silico</i> mediante Polyphen 2 de la variante p. Thr119Ile..... | 86 |

Tablas

| | |
|---|----|
| 1. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad Gell y Coombs..... | 27 |
| 2. Subclasificación de las reacciones de hipersensibilidad tipo IV..... | 28 |
| 3. Características generales de las RAM..... | 30 |
| 4. Primers de Amplificación del gen <i>GPLY</i> | 78 |
| 5. Condiciones de la PCR para la amplificación de la región codificante de <i>GPLY</i> | 79 |
| 6. Características Clínicas y Demográficas | 83 |
| 7. Resultados de análisis de secuencia región codificante del gen <i>GPLY</i> | 84 |
| 8. Análisis genético para la mutación c.11G>A en los controles..... | 86 |
| 9. Variantes de la Región Promotora..... | 88 |
| 10. Datos poblacionales de la variante del promotor - 458_447del en la población de controles..... | 89 |
| 11. Variantes de la Región Promotora identificadas por Genomatix..... | 90 |

Anexos

| | | |
|----------------|---|-----|
| Anexo 1 | Aprobación comité de ética de la Universidad del Rosario..... | 100 |
| Anexo 2 | Extracción DNA genómico por la técnica de <i>PROBE</i> | 102 |
| Anexo 3 | Análisis de Genomatix para la identificación de TBS´s sobre el promotor de la granulicina..... | 104 |

2. Resumen

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) que generan fenotipos cutáneos severos son respuestas nocivas de baja incidencia pero con alta tasa de mortalidad. Se considera que más del 35 % de individuos formulados presentaran una RAM, pero el reporte en el sistema de salud será inferior al 10 %, debido a un inadecuado método de notificación y pocos programas de farmacovigilancia efectivos (*Ralph E et al, 2000; Thong B et al, 2003*).

Las RAM más comunes son las reacciones de tipo A y las de tipo B; las reacciones de tipo A se definen con aquellas predecibles y dependientes de la administración y dosificación de un fármaco. Las reacciones de tipo B que son llamadas impredecibles, se encuentran relacionadas con la respuesta a un agente alérgico capaz de desencadenar una reacción de hipersensibilidad tipo IV con un riesgo importante de mortalidad dado su compromiso multisistémico (*Stephens MDB, 1998; Thong B et al, 2003*). En el 2008 *Chung, et al* proponen a la granulisina, como una proteína citotóxica específica en la inducción de la apoptosis en los queratinocitos en las RAM cutáneas severas Stevens Johnson (SJS) y Necrólisis Epidérmica Tóxica (NET).

En el presente trabajo se realizó la aproximación genómica de SJS/NET mediante el análisis de la región codificante y promotora del gen *GPLY*. A través de análisis bioinformáticos se identificaron sitios de fijación de factores de transcripción sobre el promotor del gen. Los resultados describen variantes de secuencia potencialmente involucradas en el mecanismo molecular subyacente a la generación del fenotipo. Este trabajo es el primero realizado en el país y busca contribuir a la identificación de biomarcadores de susceptibilidad al desarrollo de SJS/NET.

3. Introducción

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) son definidas por la organización mundial de la salud (OMS), como aquellas respuestas nocivas e involuntarias secundarias a la administración de fármacos usados a dosis profilácticas, diagnósticas o de tratamiento. Debido a su impacto económico y social las RAM son consideradas como un problema de salud público (*Ralph E et al, 2000; Stephens MDB, 1998*).

Las RAM se caracterizan por un cuadro clínico variable que se establece generalmente durante el periodo comprendido entre las primeras 72 horas y 3 semanas posteriores a la administración del fármaco. La piel es uno de los órganos más frecuentemente afectado por las RAM y se estima que hasta un 30 % de eventos medicamentosos adversos se manifiestan en reacciones cutáneas. A pesar que se han descrito varios fenotipos, los más severos son el Síndrome Stevens - Johnson (SJS) y la Necrólisis Epidérmica Tóxica (NET), cuadros de evolución rápida caracterizados por el desprendimiento de la epidermis y una reacción inmune mediada por linfocitos T citotóxicos (CTLs), por el sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) y por las células natural killer (NK) (*Stephens MDB, 1998- Jacoline CJ, et al 2015*).

Los mecanismos subyacentes con las RAM cutáneas severas son secundarios a una interacción entre el sistema inmunológico del individuo con el fármaco de una forma anormal. Sin embargo algunos factores fisiológicos pueden modificar la respuesta como lo son la edad, el sexo y las patologías de base que podrían llevar a la poliformulación (*Thong B, et al 2003*).

La respuesta no deseada a medicamentos está relacionada con alteraciones en los genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo de los fármacos, que afectan las vías farmacocinéticas y farmacodinámicas normales. Además, las variantes en los genes que codifican las proteínas relacionadas con el sistema inmunológico como el sistema HLA, generan activación y amplificación de respuesta alérgica según la susceptibilidad del individuo al alérgeno (*Ralph E et al, 2000; Lundkvist J et al, 2004*).

A través de los estudios en farmacogenética se han identificado variantes de secuencia en el ADN que influyen en la respuesta interindividual al fármaco. De esta manera se han relacionado algunos polimorfismos del complejo mayor de histocompatibilidad con la susceptibilidad a las RAM cutáneas severas. De manera precisa el alelo HLA-B*15:02 y la administración de carbamazepina, el alelo HLA-B*58:01 con alopurinol y el alelo HLA-B*57:01 con el abacavir. En ocasiones, la asociación alélica y el fenotipo cutáneo se ha evidenciado para poblaciones de origen étnico específico, lo cual es una limitante en la aplicación de los polimorfismos de HLA-B como biomarcadores de susceptibilidad para todos los pacientes (*Sánchez I et al, 2014; Borda I et al, 1968; Lavan A et al, 2016*).

Recientemente los estudios de transcriptómica en pacientes con los fenotipos SJS, SJS/NET o NET permitió describir a la granulicina como una proteína específica y relacionada con la fisiopatología de la enfermedad (*Chung et al. 2008*). Los análisis demostraron que la granulicina estaba sobreexpresada (20 veces más que lo normal) exclusivamente en la piel de los individuos con SJS/NET y que era sintetizada por células efectoras como los CTLs y las células NK, cuya función está relacionada con efectos citotóxicos.

La iniciativa de este trabajo consistió en realizar la identificación de variantes de secuencia del ADN en la región promotora y codificante del gen de la granulicina (*GNLY*) en pacientes

colombianos afectados por SJS, SJS/NET y NET. La identificación de variantes potencialmente deletéreas o que afectan la unión de factores de transcripción, permitió aportar nuevo conocimiento en la susceptibilidad para el desarrollo de RAM cutáneas severas. Esta aproximación constituye el primer trabajo que se ha realizado con un abordaje genómico de la granulicina, la cual actualmente es considerada como un indicador de la activación del sistema inmunológico.

4. Justificación

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) pueden considerarse como un problema de salud pública por su alta frecuencia, por la severidad en algunos pacientes y por su potencial impacto sobre la medicación. Las RAM, representan un alto costo económico ya que son responsables de cerca del 10 % de los ingresos hospitalarios y del escalonamiento de fármacos de mayor costo y poco disponibles en el mercado. La piel es uno de los órganos más frecuentemente afectado por las RAM y en una proporción de casos las RAM cutáneas pueden ser extremadamente graves, comprometiendo en ocasiones la vida del paciente. Éste es el caso del Síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y la Necrólisis Epidérmica Tóxica (NET), dos reacciones adversas cutáneas que involucran la activación de las células natural killer (NK) y los linfocitos T citotóxicos (CTL's) (*Chung W et al, 2012*). Los pacientes afectados de SJS o NET desarrollan un cuadro clínico severo que evoluciona rápidamente y que lleva al desprendimiento de amplias zonas epidérmicas. Cerca del 65-89 % de los casos, desarrollan secuelas de la enfermedad que afectan múltiples órganos y tejidos (*Thong et al, 2013*). A pesar de que el SJS y NET son patologías poco frecuentes (la incidencia es cercana a 2 casos por millón de habitantes por año) y su alta mortalidad (1 % al 5 % para el SJS y entre el 25 % y el 50 % para la NET) sugiere la necesidad de estudiar potenciales marcadores

moleculares predictivos. En este sentido en los últimos años se han propuesto, especialmente en la población asiática, algunas asociaciones genéticas entre alelos HLA y la susceptibilidad de aparición del SJS/TEN (*Chung W et al, 2010*). Por el contrario, en otras poblaciones no se encontró una relación estadística significativa. Desde este contexto, un estudio previo realizado por el grupo de investigación del Centro de Genética y Genómica de la Universidad del Rosario (CIGGUR) demostró que el alelo HLA-B*1502, no está asociado con la enfermedad (datos no publicados), como se ha descrito para otras poblaciones. Por consiguiente, es importante la identificación de marcadores moleculares predictivos de los fenotipos cutáneos secundarios a reacciones adversas (especialmente las más drásticas como el SJS/NET).

Recientemente, el estudio del transcriptoma en lesiones de piel de pacientes SJS/TEN permitió describir a la granulicina como una proteína crucial en la fisiopatología de la enfermedad (*Chung W et al. 2008*). En efecto, se demostró que esta proteína, sintetizada por los linfocitos T citotóxicos y las células NK, tiene un efecto citotóxico durante la apoptosis masiva de los queratinocitos (fase aguda de la enfermedad).

Sin embargo, en el SJS/NET inducido por medicamentos no se han explorado por técnicas genómicas potenciales relaciones entre las variantes en la secuencia del ADN de la granulicina y la susceptibilidad de la enfermedad.

Por consiguiente, este estudio se fundamenta en la disección genómica de la región codificante y promotora del gen *GNLY* para aportar al conocimiento de potenciales mecanismos desencadenantes del SJS/NET. El impacto de estos resultados en la salud pública puede ser de gran relevancia, puesto que permitirían sugerir información que conduzca a la descripción de nuevos marcadores moleculares predictivos de la enfermedad.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Ofrecer a la comunidad médica y científica nuevos elementos para la comprensión del mecanismo genético asociado a la susceptibilidad de desarrollar SJS/NET mediante el análisis de la región promotora y codificante del gen de la granulinsina *GNLY*.

5.2 Objetivos Específicos

- Identificar y analizar mediante secuenciación por Sanger las variantes en el ADN localizadas en la región codificante y promotora del gen *GNLY*.
- Establecer si las variantes de la región codificante y promotora de *GNLY* son causa potencial de la susceptibilidad a desarrollar SJS/NET.
- Determinar si las variantes de ADN en la región promotora de *GNLY* alteran sitios de unión a factores de transcripción que potencialmente modifiquen su transactivación.

6. Marco Teórico

6.1 Reacciones Adversas a Medicamentos

6.1.1 Definición

La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), define las reacciones adversas a medicamentos (RAM) como todo efecto nocivo e indeseable no intencionado que se presenta en pacientes tras la administración de fármacos a las dosis profilácticas, diagnósticas, terapéuticas o para modificar funciones fisiológicas a dosis normalmente utilizadas (*Ralph E et al, 2000; Stephens MDB, 1998*). Sin embargo no incluye en su definición aquellos eventos relacionados con fallos terapéuticos y sobredosificación accidental o intencional, excluyendo así el error como una fuente de efectos adversos (*Ralph E, et al 2000*).

La mayoría de los efectos adversos secundarios a la ingesta de un fármaco no son de tipo alérgico, si no que resultan de las diversas acciones e interacciones farmacológicas. Por lo anterior las características de hipersensibilidad son independientes a las acciones propias de un fármaco, ya que derivan de una respuesta del sistema inmunológico anormal (*Ralph E et al, 2000; Stephens MDB, 1998*).

Se considera que cualquier compuesto o metabolito capaz de actuar como inmunógeno, puede generar una reacción alérgica y por consiguiente la activación de una respuesta inmune capaz de desencadenar en un efecto tóxico multisistémico.

6.1.2 Incidencia

La incidencia de las RAM es de difícil estimación, sin embargo en la actualidad se cuenta con programas de farmacovigilancia que han apoyado la identificación, notificación y registro de pacientes, lo que ha permitido alimentar las bases de datos poblacionales con diversa información (*Thong B et al, 2003*). Aun así, es plausible que exista un subregistro en la notificación de las RAM's, dado que en los pacientes de atención ambulatoria la mayoría no llega a la atención clínica o no se realiza el reporte espontáneo por el sistema de salud (*Thong B et al, 2003; Jacoline C et al, 2015*). En diversos estudios se estima que solo del 6 % al 10 % de todos los casos de RAM se reportan actualmente al sistema de farmacovigilancia, esta afirmación refuerza la tesis de la baja notificación por parte del profesional de la salud y ratifica la necesidad de mejorar los programas de farmacovigilancia como estrategia fundamental para la detección de las RAM (*Lundkvist J et al, 2004; Sánchez I et al, 2014*).

Pese a las consideraciones anteriores, se ha logrado evaluar el impacto de las RAM en poblaciones con sistemas de notificación activos en diferentes áreas de atención clínica. Se conoce que las RAM a pesar de su baja incidencia son causa de morbilidad en los pacientes, la cual puede ser reducida teniendo en cuenta que más del 60 % son potencialmente prevenibles. De esta manera un adecuado conocimiento y notificación podría disminuir la incidencia de dichos eventos no deseados (*Sánchez I et al, 2014*).

Borda et al, describe que aproximadamente el 35 % de los pacientes formulados han presentado al menos una RAM al administrar el fármaco (*Borda I et al, 1968*), evento que se ve reflejado en un aumento significativo de ingresos al servicio de urgencias reportando incidencias que oscilan entre el 0.5 % al 12.8 % según la población evaluada (*Jacoline C et*

al, 2015; Lavan A et al, 2016; Lavan A et al, 1998; Demoly P et al, 2001). La incidencia reportada en los pacientes hospitalizados que experimentan una RAM es entre un 5 % a un 10 % de la población internada (*Demoly P et al, 2001; Bates W et al, 1993*), dadas las condiciones de susceptibilidad, poliformulación y patologías asociadas. Estos factores también se han asociado con la prolongación de la estancia hospitalaria entre un 9 % a 12 % según lo descrito en literatura (*Borda I et al, 1968; Lavan A et al, 2016*). En el caso de los pacientes ambulatorios el número de estudios es limitado por falta de información con respecto a la epidemiología de las RAM, sin embargo el estudio de *Sarkar U et al*, refiere que corresponde al 0.5 % de las visitas ambulatorias, presentándose el 60 % en la atención primaria y solo el 40 % en la atención por especialista (*Bates WD et al, 1993; Kaushal R, et al, 2012; Sarkar U et al, 2011*).

Se considera que la mayoría de prescripciones se realiza en el ámbito ambulatorio por lo que se espera una incidencia mayor, pero la escases de referencia sobre las RAM se explican por diversos factores, entre ellos la falta de información por parte de los pacientes frente a la automedicación, el poco reconocimiento por parte del médico de los síntomas y la pobre información efectiva sobre la formulación (*Sarkar U et al, 2011; Gandhi T et al, 2003; Gertler S et al, 2016*).

La tasa de mortalidad descrita en las RAM en general oscila entre el 0.14 % a 0.5 %, esta tasa es evaluada en pacientes hospitalizados debido a la facilidad en el seguimiento y desenlace. A pesar de describirse en la literatura con una baja mortalidad, es claro que en las RAM cutáneas severas la mortalidad es mayor, esta afirmación depende de la superficie corporal total (SCT) afectada, describiéndose hasta en un 50 % la mortalidad cuando el compromiso es mayor al 30 % SCT. (*Jacoline C et al, 2015; Lavan A et al, 1998*).

Aunque se conoce la información epidemiológica internacional se debe tener en cuenta que el perfil de las RAM puede modificarse de una población a otra según sus características étnicas, socioculturales y genéticas; en nuestro país se dispone de pocos estudios epidemiológicos que dificulta tener un dato aproximado, esto ha permitido la introducción de la cultura de la farmacovigilancia que en los últimos años ha desarrollado el INVIMA en relación con la normatividad “*La resolución 1403 de 2007*” que establece los lineamientos básicos para la farmacovigilancia y asigna responsabilidades creando un programa nacional (*Rojas C et al, 2013; Calderón C et al, 2011*).

En la práctica clínica se han realizado estudios con pacientes de especialidades como medicina interna o servicios específicos y estudios bajo control activo de notificación, que han permitido llevarnos una idea del comportamiento de las RAM sin embargo es necesario más estudios poblacionales (*Rojas C et al, 2013; Calderón C et al, 2011; Vallejos A et al, 2007*).

Los datos epidemiológicos en una recopilación de información de 10 años realizado por *Calderón C et al 2011*, sugieren que la incidencia de las RAM en pacientes hospitalizados oscila entre el 1.2 % al 45 % explicando que la gran variabilidad de las cifras podrían verse influidas por la detección, notificación y el tamaño de la muestra (*Rojas C et al, 2013; Calderón C et al, 2011*), con un aumento de la estancia hospitalaria adicional de 15,7 % (*Tribiño G et al 2006*). Lo evaluado en pacientes ambulatorios de consulta prioritaria y consulta general oscila entre el 2.8 % y 6.4 % (*Calderón C et al, 2011*).

Por lo anterior se observa que la incidencia de las RAM presenta intervalos muy amplios, valores que dependen de los factores de la población evaluada, pues se describe una mayor probabilidad de presentación con la edad, la polimedicación, polimorfismos genéticos y

patologías de base. También se debe tener en cuenta que la estrategia de notificación de las RAM espontánea tiene el inconveniente del subregistro, ya que al comparar estudios donde se aplicó farmacovigilancia activa se detectan más eventos y puede diferir entre estudios aplicados a poblaciones similares (*Calderón C et al, 2011*).

El impacto socioeconómico de las RAM se refleja en el aumento de los costos en su atención en salud que aumenta hasta un 20 % el gasto dado por aumento en la estancia hospitalaria, toma de exámenes paraclínicos adicionales, uso de fármacos y otros costos indirectos (*Lavan A et al, 2016; Tribiño G et al, 2006*). Una proyección de costos en la atención de las RAM en el sistema de salud colombiano estimó en el año 2003 un costo que oscila entre 25 millardos y 75 millardos valores a los que se extrapoló al 2010 con un gasto aproximado de 53 a 160 millardos (*Segura O et al, 2003*). Lo anterior implica la importancia de prevenir los eventos adversos que genere un impacto en la reducción en los costos de atención médica, que según *Segura O et al, 2003*, puede ser hasta de un 60 %. A pesar de este panorama y las limitaciones actuales en el sistema de salud colombiano, se cuenta con una plataforma en línea generada por la agencia de farmacovigilancia que permite sacar datos estadísticos, registro que informa que para el 2016 se recibieron 72.024 eventos adversos, 606 reportes periódicos 2.559 errores de medicación, 1818 a fallos terapéuticos y 67.029 a RAM de las cuales el 35 % eran cuadros severos y el 65 % no serias (*INVIMA, 2017*).

Se deben plantear estudios de farmacoepidemiología y reforzar programas de farmacovigilancia que generen un sistema de notificación activo y permita determinar con mayor certeza la epidemiología de las RAM.

6.1.3 Clasificación de las RAM

Las RAM pueden clasificarse de acuerdo a sus diferentes características, como son su grado de severidad, la relación de causalidad (causa – efecto) y clínicamente de acuerdo a la dosis, tiempo de prescripción y presencia de factores de susceptibilidad (*Calderón C et al, 2011*).

Los diferentes sistemas disponibles para su evaluación se centran en escalas o algoritmos que permiten clasificarlas. Según la severidad se basa en el grado de compromiso describiéndolas como serias y no serias, la evaluación de causalidad se estima por medio de algoritmos como los establecidos por Naranjo Cols, OMS (WHO-ART) y MedDRA entre otras y clínicamente de acuerdo a su mecanismo de generación relacionado con los mecanismos de toxicidad directa y las alteraciones en la farmacodinamia y farmacocinética de la molécula (*Calderón C et al, 2011; Kaufman G, 2016*).

La evaluación clínica es tradicionalmente usada y se caracteriza por congregarse en diferentes grupos denominados con letras que se caracterizan en relación con la dosis, el tiempo de exposición y la acción farmacológica de los fármacos. Los tipos de reacciones adversas más comunes son los de tipo A y B y las reacciones menos frecuentes son las de tipo C, D, E y F (*Ralph E et al, 2000; Kaufman G, 2016; Ankur R et al, 2013*).

6.1.3.1 Reacciones de tipo A

Las reacciones de tipo A son también llamadas “*Augmented*” o esperadas, su frecuencia se reporta entre un 85 % al 90 % de todas las RAM. Este grupo se caracteriza porque la respuesta farmacológica está relacionada con la concentración del fármaco en el plasma o en los tejidos lo que aumentaría su efecto, los factores relacionados con esta respuesta son la dosis, el tiempo de administración o exposición y las características propias del fármaco. Este tipo de

reacción es reversible al realizar la reducción de la dosis o la suspensión del fármaco lo que favorece una respuesta clínica de menor compromiso sistémico (*Kaufman G, 2016; Ankur R et al, 2013; Pourpak Z et al, 2008; Pichler W 2004; Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D. C, ed 2013; Riedl A et al, 2003*).

Dentro de estas reacciones predecibles consideradas no inmunológicas se pueden encontrar:

- *Efectos colaterales*: Son efectos no deseados a dosis normales del fármaco, que se relacionan directamente con las propiedades de la molécula y su acción farmacológica.
- *Sobredosis*: Es una respuesta tóxica, secundaria al exceso de dosis de un fármaco que ocurre de forma intencional o no intencional. Por otro lado, la toxicidad también puede ser debida a la disminución en la excreción del fármaco, que lleva al aumento de su concentración en plasma y tejidos.
- *Interacciones farmacológicas*: La prescripción de dos o más fármacos puede generar una disminución o un aumento en la respuesta de cada uno de ellos, generando una respuesta indeseada.
- *Efectos secundarios*: Son los efectos indeseados referidos por el paciente, como una consecuencia eventual, pero no se relaciona con la acción farmacológica del medicamento.
- *Toxicidad acumulativa*: Se presenta por depósito de fármacos o metabolitos en los tejidos u órganos.

Las causas farmacocinéticas de las reacciones de tipo A, se pueden atribuir a causas genéticas como polimorfismos o mutaciones en las enzimas metabolizadoras o transportadoras que se relacionan con el metabolismo y la distribución del fármaco. Además, las enfermedades que

alteran el tejido hepático o el tejido renal también modifican el metabolismo, la absorción, la distribución y la eliminación del fármaco o sus metabolitos activos (*Ankur R et al, 2013*).

Las causas farmacodinámicas de las reacciones tipo A se relacionan con las enfermedades hepáticas que favorecen la producción de proteínas como factores de coagulación que podrían causar una RAM si se administran anticoagulantes o la alteración hidroelectrolítica podría favorecer o potenciar la acción de un fármaco como en el caso de los glucósidos cardiacos (digitálicos) en los estados de hipopotasemia o hipercalcemia (*Ankur R et al, 2013*).

6.1.3.2 Reacciones de tipo B

Las reacciones de Tipo B o de hipersensibilidad, son también llamadas impredecibles o “*Bizarre*” y se presentan en el 10 % a 15 % de los pacientes con RAM; son menos comunes que las de tipo A, pero a menudo son más graves y se asocia con alta mortalidad (*Kaufman G, 2016; Pourpak Z et al, 2008*). Este tipo de reacciones son independientes de la dosis y pueden tener o no un origen inmunológico. Este grupo se caracteriza por una respuesta exacerbada o exagerada a un agente alérgeno o inmunógeno que es tolerado por la mayoría de pacientes, sin embargo existe un grupo de individuos que exacerbaban este fenotipo causando una RAM generalmente de características moderadas a severas (*Kaufman G, 2016; Ankur R et al, 2013; Pourpak Z et al, 2008; Pichler W, 2004*).

Las causas farmacocinéticas de las reacciones tipo B o bizarras, se presentan tras la alteración en la absorción o distribución del fármaco, consecuencia del proceso de bioactivación que genera cambios conformacionales y especies reactivas que interactúan con el sistema inmunológico. Los factores farmacodinámicos en este tipo de respuesta están asociados con

la respuesta interindividual a fármacos, que se explica por la susceptibilidad genética de cada individuo (*Ankur R et al, 2013*).

Las respuestas de tipo B se consideran inmunológicas y no inmunológicas. Las respuestas no inmunológicas e impredecibles como las pseudoalérgicas se caracterizan por activación de mastocitos generando una respuesta similar a la hipersensibilidad de tipo I inmunológica, otra respuesta es la idiosincrática que se relaciona con una respuesta aberrante que no se explica por la acción del fármaco, como se observa en los pacientes con deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6DP) que desarrollan anemia hemolítica tras la administración de ciertos fármacos y las respuestas de intolerancia que se define como un umbral inferior para la acción del fármaco a dosis normalmente administradas (*Riedl A et al, 2003*).

Las respuestas inmunológicas o impredecibles se generan por mecanismos inmunológicos heterogéneos relacionados con el fármaco y se definen en cuatro grupos de reacciones de hipersensibilidad (I-IV) (*Bates W et al, 1993; Kaufman G, 2016*). El grupo I es dependiente de inmunoglobulinas (IgE), el grupo II se caracteriza por la activación del complemento, el grupo III por los complejos proteicos “antígeno – anticuerpo” y el grupo IV por la activación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) Tabla 1 (*Kaufman G, 2016; Pourpak Z et al, 2008; Pichler W, 2004*).

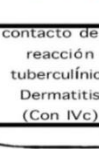
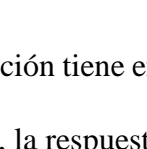
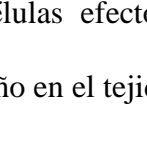
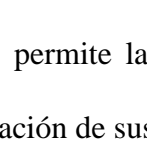
Tabla 1. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad Gell y Coombs, *Tomado y modificado (Riedl A et al, 2013)*

| TIPO | MECANISMO INMUNITARIO | CLINICA | TIEMPO DE LA REACCION |
|----------------------|--|--|---|
| I. Tipo Anafiláctico | <ul style="list-style-type: none"> - Secreción de IgE. - Liberación de aminas vasoactivas. | <ul style="list-style-type: none"> - Urticaria - Angioedema - Broncoespasmo - Vomito - Anafilaxia | <ul style="list-style-type: none"> - Minutos a horas después de la exposición al fármaco |
| II. Tipo Citotóxico | <ul style="list-style-type: none"> - Formación de IgG e IgM que se une antígenos de células blanco. - Activación de Complemento. | <ul style="list-style-type: none"> - Anemia hemolítica - Citopenias - Eritroblastosis fetal - Enfermedad de Goodpasture | <ul style="list-style-type: none"> - Variable |
| III. Inmunocomplejos | <ul style="list-style-type: none"> - Activación de complejos Ag-Ac. - Liberación de enzimas lisosomales. | <ul style="list-style-type: none"> - Fiebre - Rash - Artralgias - Linfadenopatías - Glomerulonefritis - Vasculitis | <ul style="list-style-type: none"> - 1 a 3 semanas posterior a la exposición del fármaco |
| IV. Celular Tardía | <ul style="list-style-type: none"> - Linfocitos T sensibilizados. - Activación de MHC | <ul style="list-style-type: none"> - Dermatitis contacto - Rechazo Trasplantes - DRESS – SJS – NET - Granulomas | <ul style="list-style-type: none"> - 2 a 7 días posterior a la exposición del fármaco |

❖ **MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

En la generación de las reacciones de hipersensibilidad tipo I, II y III se encuentran involucrados anticuerpos, mientras que en las reacciones de hipersensibilidad tipo IV la respuesta no deseada se produce por la interacción de las células efectoras de linaje T específicas de antígeno (*Riedl A et al, 2013; Baldo B, 2013*). Estas reacciones de hipersensibilidad tipo IV se subdividen de acuerdo a las células efectoras involucradas y a las moléculas mediadoras, que actúan como causales de reacciones cutáneas leves o severas que se describen en la Tabla 2 (*Riedl A et al, 2013; Baldo B, 2013; Greener M, 2014*).

Tabla 2. Subclasificación de las reacciones de hipersensibilidad tipo IV, Tomada y modificada (Bates *et al*, 1993)

| TIPO | Tipo IV a | Tipo IV b | Tipo IV c | Tipo IV d |
|--|---|--|---|---|
| Reactante Inmune | IFN- γ TNF- α (Células Th1) | IL-5-, IL-4/IL-13 (Células TH2) | Perforina / Granzima Fas Ligando | CXCL-8 GM-SF (Células-T) |
| Antígeno | Antígeno soluble presentado por Células o estimulación T directa de células | Antígeno soluble presentado por Células o estimulación T directa de células | Antígeno Célula-Asociado o estimulación T directa | Antígeno soluble presentado por Células o estimulación T directa de células |
| Mecanismo Efectores | Activación de Macrófagos | Eosinófilos | Células T | Neutrófilos |
| |  |  |  |  |
| Ejemplo de reacción de Hipersensibilidad | contacto de la reacción tuberculínica Dermatitis (Con IVc) | Asma crónica Rinitis Alérgica Crónica Exantema maculopapular con eosinofilia | Dermatitis de contacto maculopapular y hepatitis bullosa del exantema | AGEP Síndrome de Behçet |

Células Regulatorias-T (T-reg CD4+/CD25* y/o IL-10/TGF- β Células secretantes)

Esta subclasificación tiene en cuenta la producción de moléculas como citoquinas secretadas por las células T, la respuesta de citotoxicidad mediada por granzima, perforina, Fas/FasL y las diferentes células efectoras como monocitos, eosinófilos y neutrófilos que causan inflamación y daño en el tejido (Werner *J et al*, 2011).

La clasificación de tipo A y tipo B, son reacciones ampliamente estudiadas dada su frecuencia, esto permite la evaluación clínica de los pacientes, que permite realizar una adecuada tipificación de sus principales diferencias como se describen en la Tabla 3.

6.1.3.3 Reacciones de tipo C

Las reacciones de tipo C o de tipo crónico, se consideran como reacciones generadas por efectos prolongados, secundarios al consumo de fármacos a largo plazo. Clínicamente se presentan en una gama de efectos graves o leves que logran tener impacto en la salud pública,

ya sea por toxicidad o diagnósticos de enfermedades crónicas (*Greener M, 2014; Werner J et al, 2011*). Estos resultados se presentan por un efecto acumulativo del fármaco, presentando los eventos adversos de una forma gradual (*Kaufman G, 2016; Pourpak Z et al, 2008; Werner J et al, 2011*).

Un ejemplo de este tipo de reacción, es la presentación de osteonecrosis de la mandíbula tras el consumo prolongado de bifosfonatos (*Kaufman G, 2016; Otero J et al, 2011*).

6.1.3.4 Reacciones de tipo D

Las reacciones de tipo D o también llamadas reacciones adversas tardías, son aquellas que se describen después de finalizar el consumo del fármaco por un tiempo. Su detección y descripción se dificulta por la falta de seguimiento de algunos pacientes frente a los efectos tóxicos prolongados de algunos fármacos (*Kaufman G, 2016; Pourpak Z et al, 2008; Greener M, 2014; Werner J et al, 2011*).

Un ejemplo de este tipo de reacción son las citopenias que se pueden presentar con los tratamientos antitumorales hasta 6 semanas posterior a la finalización de su administración o los efectos carcinogénicos y teratogénicos de algunos fármacos.

6.1.3.5 Reacciones de tipo E

Las reacciones de tipo E, se presentan cuando el tratamiento es interrumpido de forma abrupta o repentina causando un efecto rebote. Un ejemplo de este tipo de reacción es la suspensión de los fármacos tipo ansiolíticos como las benzodiazepinas que pueden generar en el paciente un síndrome de abstinencia entre otros (*Pourpak Z et al, 2008; Greener M, 2014*).

6.1.4 Mecanismos Inmunológicos y Genéticos de las RAM

Los mecanismos asociados a las RAM, se relacionan con eventos celulares y moleculares que interaccionan para montar una respuesta inmunológica que se manifieste por medio de un fenotipo particular. La expresión clínica de esta respuesta está precedida ya sea, por el proceso de sensibilización a fármacos y metabolitos que conlleva a la activación de células efectoras o a la susceptibilidad genética del individuo que puede modificar rutas metabólicas e interacciones proteicas, causales de las respuestas inmunológicas amplificadas de forma anómala (*Greener M, 2014; Schyder B et al, 2009*).

6.1.4.1 Mecanismos Inmunológicos de las RAM

Las respuestas inmunológicas en las reacciones adversas, son procesos considerados patológicos y se presentan posterior a la interacción específica entre un antígeno (Ag) y un anticuerpo (Ac) con la cooperación específica de linfocitos T sensibilizados o una interacción inespecífica mediada por células NK asociado a la expresión de moléculas pro apoptóticas (*Greener M, 2014; Schyder B et al, 2009*).

6.1.4.1.1 Sensibilización a Fármacos

El proceso de sensibilización a los fármacos, implica un estímulo primario, que se presenta cuando el alérgeno (antígeno) entra en contacto con el sistema inmunológico, lo que conduce al reconocimiento y a la expresión clonal de los linfocitos T y B activados. Posteriormente, se espera la producción de anticuerpos con características específicas de tipo inmunoglobulinas (Ig) (*Greener M, 2014; Schyder B et al, 2009; Landsteiner K et al, 1935*). Este proceso permite el reconocimiento ante una nueva exposición del fármaco. En cuanto al riesgo de sensibilización y la gravedad clínica de la respuesta no deseada son determinantes

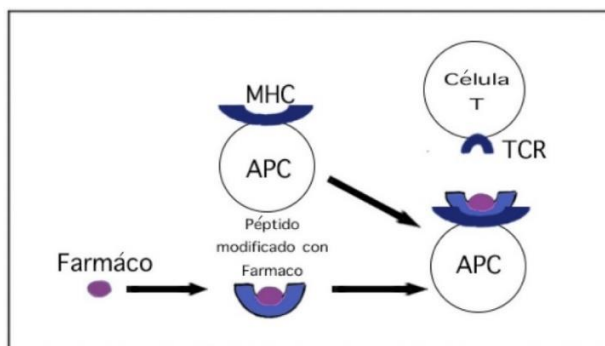
factores tales como; el estado de activación inmune del paciente, la dosis del fármaco, la frecuencia de la administración, el tiempo de la exposición y la ruta de interacción del alérgeno (fármaco) (*Schyder B et al, 2009; Landsteiner K et al, 1935*).

El mecanismo secundario a las reacciones de hipersensibilidad al fármaco es explicado por la presencia de pequeñas moléculas generalmente menores a 1 KDa, capaces de activar el sistema inmunológico por diversos mecanismos, en este escenario se encuentran los fármacos o sus metabolitos activos derivados de la bioactivación, proceso de biotransformación que determina una acción detoxificante o tóxica causando daño celular. Estas moléculas pueden comportarse como haptenos, pro-haptenos o realizar interacciones farmacológicas directas con receptores inmunes, acción que ha sido denominada como “el concepto p-i” (*Schyder B et al, 2009*).

6.1.4.1.1 Concepto Hapteno

Landsteiner y Jacobs en el año 1935 describieron por primera vez el concepto de hapteno mediante la identificación de la relación directa que se establece entre la reactividad de alérgenos químicos y las proteínas sensibilizadas (*Landsteiner K et al, 1935*). Así, un hapteno se define como una molécula químicamente reactiva que se une de forma covalente a una proteína, formando un complejo (péptido – fármaco) que es reconocido por las células presentadoras de antígenos (APC) y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Como consecuencia, se produce la activación de las células naive circulantes, que al interactuar con las células APC favorecen la expansión clonal de las células T efectoras y de las células T de memoria. (figura 1) (*Schyder B et al, 2009; Landsteiner K et al, 1935*).

Figura 1. Mecanismo de hapteno/prohapteno, Tomado y modificado (Schyder B et al, 2009)



6.1.4.1.1.2 Concepto Prohapteno

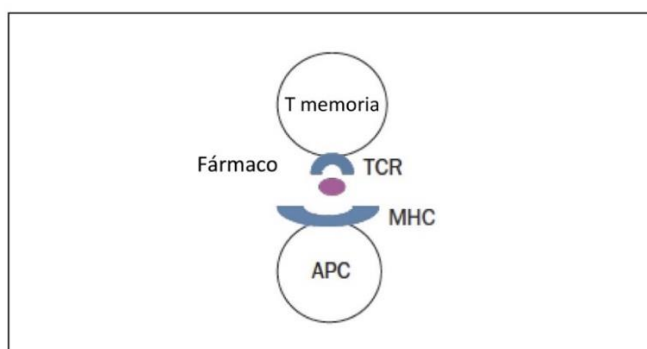
El prohapteno se caracteriza por ser una molécula inerte que debe pasar por un proceso de bioactivación para adquirir reactividad y facilitar la formación del complejo péptido – fármaco, para así ser reconocido por las células APC y el MHC (figura 1) (Schyder B et al, 2009).

Dado que las moléculas que forman haptenos o pro-haptenos, son activas sólo si se unen de manera covalente con las proteínas circulantes, es plausible pensar que este mecanismo es insuficiente para explicar algunas reacciones de hipersensibilidad donde se revierte la respuesta inmunogénica ante la suspensión del fármaco (Schyder B et al, 2009). En este contexto, algunas moléculas tienen la capacidad de transmitir una señal a través del reconocimiento del receptor de linfocitos T (TcR) que se activa de forma autónoma sin requerir la interacción con las células APC. Esta vía de activación explica la regresión de los efectos causados por la reacción alérgica, luego que el fármaco involucrado es suspendido. El mecanismo subyacente a este efecto se denomina el concepto “p-i” y será descrito a continuación (Greener M, 2014; Schyder B et al, 2009).

6.1.4.1.1.3 Concepto “p-i”

El concepto p-i se define como la interacción farmacológica directa de moléculas con receptores inmunes específicos tipo TcR (figura 2). Este concepto emerge de un estudio *in vitro* realizado por Shnyder y colaboradores en 1997, en el que se exponen células T a fármacos y se fijan las células APC para evitar su reconocimiento, observando que el fármaco puede ser presentado a las células T independientes del MHC y desencadenar una respuesta (Schyder B et al, 2009).

Figura 2. Concepto p-i (interacción farmacológica de drogas con receptor inmune), Tomado y modificado (Schyder B et al, 2009).



Pichler et al 2004, refieren que para poder definir el concepto p-i, los linfocitos T deben tener ciertas características que permitan su reactivación frente a un inmunógeno. Dentro de las propiedades mencionadas, las células T deben expresar en su membrana el receptor TcR y tener un bajo umbral de activación que permita su estimulación frente a una señal no amplificadas (figura 2). Además, se debe presentar la interacción posterior entre el receptor con moléculas del MHC y células APC (Werner J et al, 2011; Schyder B et al, 2009). Esto explica el compromiso de la piel como respuesta a la administración sistémica de fármacos en las reacciones de hipersensibilidad, ya que hay un gran número de linfocitos T de memoria

y de células dendríticas con capacidad de presentar antígenos asociados al MHC (*Schnyder B et al, 1997*).

Un gran porcentaje de los fármacos ejercen sus efectos en diversos tejidos donde llegan a través de la circulación. Se debe tener en cuenta que estos fármacos pueden interactuar con el sistema inmunológico adaptativo, donde particularmente los linfocitos T de memoria y células dendríticas actúan como células centinela, lo que explica la respuesta multisistémica con mayor compromiso cutáneo en las reacciones adversas (*Schnyder B et al, 1997*).

En la respuesta inespecífica, no se requiere previa sensibilización, ni reconocimiento (Ag-Ac). Este mecanismo está mediado por las células NK quien ejerce una función efectora y secretora de moléculas citotóxicas, mediado por interacciones de adhesión celular (*Landsteiner K et al, 1935; Schnyder B et al, 1997*).

6.1.4.1.2 Citotoxicidad Mediada por Células

La citotoxicidad mediada por células, juega un papel esencial en la respuesta inmune innata y específica induciendo a la muerte de las células diana. De manera fundamental este proceso de citotoxicidad es mediado por las células T (CTLs) y células Natural Killer (NK) a través de dos mecanismos (*Golstein P et al, 1991*). El primero implica la secreción de gránulos citotóxicos, en una acción dependiente de Calcio (Ca^{++}) y del contacto posterior con la célula blanco (*Golstein P et al, 1991; Peter C, 1993*). Estos gránulos contienen en su interior proteínas citotóxicas con capacidad lítica capaces de alterar la membrana celular por medio de la formación de poros (perforina). Dicho evento favorece la circulación de otras moléculas proteolíticas, como granzima A-B y la granulicina, que se caracterizan por desempeñar funciones proapoptóticas (*Díaz L et al, 2005; Orrenius S et al, 2011*).

En el segundo mecanismo se produce la interacción de una proteína de superficie conocida como Fas (CD95) o proteína apoptótica (Apo-1). Esta proteína, de 36 KDa y de expresión ubicua pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y posee un dominio citoplasmático de muerte celular (FADD). La actividad citotóxica se produce por la interacción de Fas con su ligando FasL (CD95L), una glicoproteína transmembranal de 40 kDa que pertenece a la familia TNF (*Peter C, 1993; Wehrli P et al, 2000; Elmore S, 2007*).

6.1.4.1.2.1 Células Natural Killer (NK)

Las células Natural Killer (NK) o también llamadas células nulas, se describieron inicialmente en el año 1975 (*Vivier E et al, 2011*), como unos linfocitos grandes granulares con capacidad natural para inducir directamente la muerte celular sin requerir previa sensibilización (*Moretta L et al, 1994*). Posteriormente las células NK se definieron como células citotóxicas efectoras, dada su capacidad productora de citoquinas y proteínas líticas (*Moretta L et al, 1994; Shi F et al, 2011*).

Desde su identificación se ha demostrado que las células NK contribuyen al sistema inmunológico innato, para generar una respuesta de características inespecíficas que no confiere inmunidad a largo plazo. Sin embargo, en los últimos años se ha sugerido en la literatura que las células NK poseen características de inmunidad adaptativa, como la longevidad y la memoria inmune (*Sun J et al, 2011*).

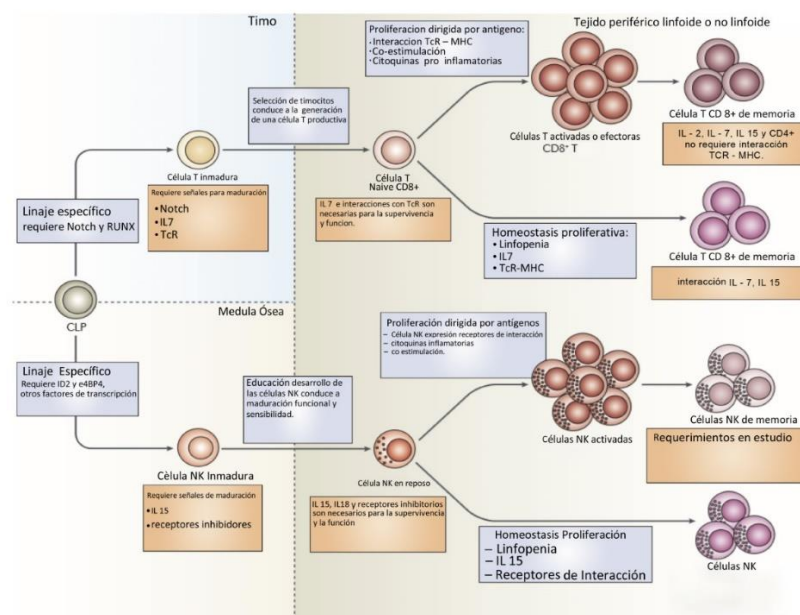
6.1.4.1.2.1.1 Origen y Diferenciación de las Células NK

Las células NK, presentan un progenitor común linfoide con los linfocitos T en la médula ósea. La diferenciación específica en células NK es dependiente de una fina regulación de efectores como el inhibidor de unión a ADN 2 (ID2) y el factor básico de transcripción en

cremallera de leucina (E4BP4) entre otros. Durante el proceso de maduración en la médula ósea se requiere la estimulación de moléculas como la interleuquina 15 (IL-15) y otras señales que conducen a la adquisición de características específicas de las células NK, como la expresión de moléculas de adhesión, la superficialización de receptores inhibidores y activadores que le permiten obtener la competencia funcional de célula efectora para la inmunovigilancia como se observa en la (figura 3) (Sun J et al, 2011).

Una vez salen de la médula ósea a la sangre periférica las células NK han adquirido la competencia funcional para responder de forma robusta y ágil a un evento dañino, sin embargo estas células siguen experimentando un mayor grado de diferenciación y modificación funcional que origina cambios fenotípicos y funciones inmunes específicas. Una de las moléculas involucradas en la citotoxicidad es la estimulación de IL18 a nivel periférico, se considera que aquellas células en reposo que no recibieron estimulación fueron defectuosas en la citotoxicidad (Sun J et al, 2011; Raulet D et al, 2006).

Figura 3. Origen y Diferenciación de células NK y CTL CD8+, Tomado y modificado (Sun J, et al 2011)



Las células NK se pueden localizar en tejidos linfoides primarios como la médula ósea y el timo, también en tejidos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, el bazo, la mucosa gástrica y el tracto respiratorio. Dada su función centinela se pueden localizar en otros tejidos no linfoides (*Vivier E et al, 2011; Sun J et al, 2011*). En sangre periférica las células NK se encuentran entre un 2 a 18 % como rango normal con un recambio celular de aproximadamente cada 2 semanas y un recuento celular menor a los linfocitos (*Gismondi A et al, 2010*).

6.1.4.1.2.1.2 Función de las Células NK

La función principal de las células NK está determinada por su actividad citotóxica en la respuesta inmune innata y su capacidad de amplificar la respuesta inmune local (*Sun J et al, 2011*). Esta célula tiene la capacidad de identificar células anormales que presenten: cambios en su estructura celular, disminución en la expresión de MHC-I, identificación de anticuerpos de exposición a microorganismos o a sustancias xenobióticas. La actividad citotóxica conduce a un proceso de destrucción por medio de la degranulación y liberación de sustancias proapoptóticas como la granzima, la perforina y la granulicina entre otras (*Gismondi A et al, 2010; Vivier E et al, 2008; Yokoyama W et al, 2003*).

La activación de las células NK no requiere la interacción con el receptor de antígeno TcR, ya que ellas carecen de estos receptores y esto conduce a una respuesta inespecífica. Su activación conlleva al reconocimiento de la célula diana por la ausencia o disminución de las moléculas de MHC-I o por el aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias en la superficie celular, que interactúan con ligandos asociados a citotoxicidad. Dentro de ellos, las interleucinas (IL) y de manera más precisa la IL2 es determinante y favorece la

proliferación clonal que conlleva a una respuesta inmunológica inicial rápida (Gismondi A et al, 2010; Yokoyama W et al, 2003; Germain R, 2002).

Figura 4. Activación de la célula NK, Tomado y modificado (Gismondi A et al, 2010)

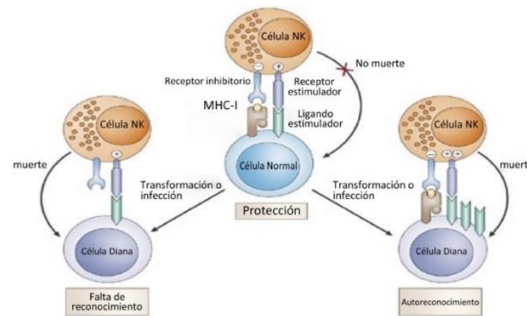


Fig. 4 Dentro de las vías antagonicas, se encuentra la expresión de MHC-I en la célula diana que bloquea la activación de las células NK. Pero la pérdida o disminución de MHC-I en superficie y aumento de receptores estimuladores activan la función citotóxica de las células NK.

Además de su actividad citotóxica, las células NK cumplen funciones en los procesos de regulación celular lo cual se ve favorecido por la capacidad secretora, que permite liberar al medio celular citoquinas, interferones alfa – gamma y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Estas proteínas se han involucrado en procesos de proliferación, diferenciación, activación celular y muerte celular (figura 5) (Vivier E et al, 2008).

Figura 5. Funciones de las células NK, Tomado y modificado (Vivier E et al, 2008)

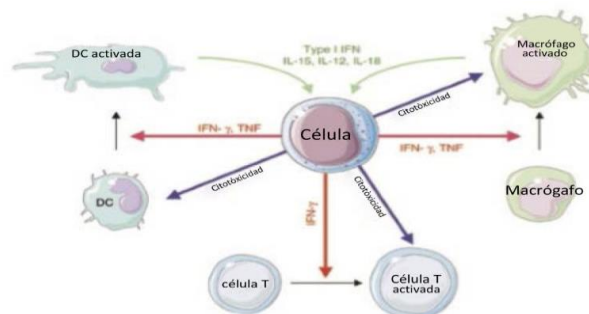


Fig. 5. Las células NK pueden aumentar la maduración de células dendríticas, macrófagos y células T como se observa en las flechas rojas, pero también tienen la capacidad de matar células dendríticas inmaduras, CD4 activadas o macrófagos hiperreactivos flechas moradas. Las células NK también pueden ser estimuladas por células dendríticas y macrófagos maduros como se observa en las flechas verdes por medio de IL-2 entre otros.

Es necesario tener en cuenta que las células NK se caracterizan por mecanismos sofisticados y robustos que controlan el inicio de procesos citolíticos, procesos que se encuentran regulados de manera estricta por proteínas de membrana que controlan la activación o inactivación de la célula NK, cuando este evento se desregula puede producir daños en células vecinas y enfermedad de autoinmunidad (*Sun J et al, 2011*).

6.1.4.1.2.2 Linfocitos T Citotóxicos (CTLs)

Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) hacen parte de la respuesta celular adquirida y se caracterizan por ser dependientes de antígeno, lo que define la especificidad de la respuesta inmunológica. A diferencia de las células NK su mecanismo de respuesta máximo es retardado, pero posterior a la respuesta de hipersensibilidad se presenta una memoria inmunológica ante una nueva exposición. Los linfocitos T citotóxicos o también llamados CD 8+ por la presencia del receptor CD 8 en su membrana, están encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular (*Germain R, 2002*).

6.1.4.1.2.2.1 Origen y Diferenciación de los CTLs

Los linfocitos T hacen parte de la población leucocitaria, grupo celular responsable de coordinar la respuesta inmune de forma programada. La designación de linfocitos T se debe a que su sitio de maduración tiene lugar en el timo, tejido conocido como un órgano linfoide primario. Estas células se caracterizan por la interacción de receptores de membrana capaces de reconocer antígenos aglutinados en otras superficies celulares (*Germain R, 2002; Lai A, et al, 2008*).

Los linfocitos T presentan un progenitor común linfoide en la médula ósea, que necesita la estimulación de los factores de transcripción como NOTCH y RUNX para generar células T

inmaduras. Para su proceso de maduración las células T estimuladas migran al timo, lo que desencadena la expresión del receptor TcR y de algunas proteínas de membrana como CD 4 o CD 8 (*Sun J et al, 2011*).

Una vez en el timo, las células producen IL -7 que favorece la proliferación del primer precursor T llamado Pro-T. Esta etapa se caracteriza por el reordenamiento de los genes que codifican las cadenas β del TcR por medio de recombinación que esta mediada por V (D) J recombinasa, pero en esta fase todavía no se expresa ningún receptor en membrana, por lo que se denominan doblemente negativos (figura 3) (*Germain R, 2002; Lai A et al, 2008; Janeway C et al, 2001*).

La siguiente etapa es llamada Pre-T, en la cual, si la recombinación se ha realizado de forma satisfactoria y se sintetiza la cadena β del receptor TcR, se producirá su expresión en la superficie celular y favorecerá la codificación de la cadena α para finalizar su conformación. En caso de no expresar en superficie las cadenas $\alpha \beta$, la célula debe entrar en apoptosis y aquellas que expresaron el receptor TcR, coexpresan otras proteínas de linaje como CD 3 y proteínas específicas de función como CD 4 y CD 8 (*Germain R, 2002; Lai A et al, 2008; Janeway C et al, 2001*).

Finalizada la formación de las proteínas de interacción en la membrana, se da lugar a la selección positiva o negativa. En donde el linfocito T que tiene expuesto en su membrana diferentes tipos de TcR $\alpha\beta$, se exhibe a los antígenos que vienen presentados por el MHC. En caso que el linfocito reconozca la molécula en el timo esta célula sobrevive, si el linfocito reconoció las moléculas MHC- I perderá el receptor CD 4 y sí reconoce las moléculas MHC – II perderá el receptor CD 8. Si el linfocito no es capaz de reconocer un péptido propio, esta célula entrará en apoptosis dado que podría causar autoinmunidad (*Lai A et al, 2008; Janeway C et al, 2001; Vivier E et al, 2016*).

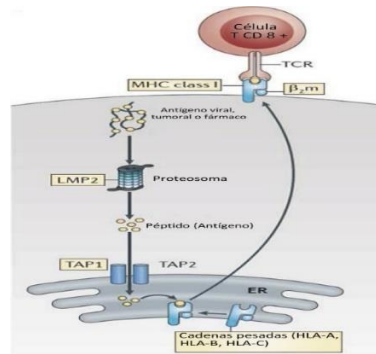
Una vez maduros los linfocitos T salen del timo a la periferia de forma circulante o en tejidos linfoides secundarios, en espera de encontrar una célula que le presente un péptido extraño capaz de activar y desencadenar una respuesta inmune (*Janeway C et al, 2001; Vivier E et al, 2016*).

La mayoría de linfocitos son TcR $\alpha\beta$, sin embargo, hay una población menos frecuente con receptor TcR $\gamma\delta$ o llamados linfocitos T intraepiteliales de mayor actividad en mucosa intestinal, pero con la misma actividad citotóxica. Además, y de manera dependiente a su función, se han descrito subpoblaciones de CTLs tales como: los linfocitos T killer o efectores, los linfocitos T helper o ayudadores y los linfocitos T supresores. Aquellos asociados con las reacciones adversas a medicamentos son los linfocitos T citotóxicos o efectores CD8+ (*Janeway C et al, 2001; Vivier E et al, 2016*).

6.1.4.1.2.2 Función de los CTLs

Los linfocitos T citotóxicos o CD 8 + tienen como función reconocer directamente los antígenos presentados por las células APC, por medio de su receptor TcR acoplado con una proteína CD 8 que se une a la molécula del MHC-I y estabiliza la interacción entre células APC y CTL/CD8+. Los antígenos que expone la célula diana deben estar unidos a una molécula de MHC- I, esta unión se presenta a nivel intracelular en el retículo endoplasmático donde posteriormente se externalizaran a la superficie para ser reconocidos por los linfocitos T CD 8+ (figura 6) (*Vivier E et al, 2016; Koretzky G et al, 2010; Kobayashi K et al, 2012*).

Figura 6. Superficialización de Moléculas MHC I en T CD 8+, Tomado y modificado (Kobayashi K, et al 2012).



Esta interacción célula – célula por medio de receptor específico, le permite ser reconocido como uno de los reguladores del sistema inmunológico. Cada linfocito T reacciona con un antígeno específico, así como cada anticuerpo actúa con un antígeno específico. Esta función le permite eliminar microorganismos o sustancias reconocidas como exógenas, también favorecer el estímulo antigénico de los linfocitos T CD8 + vírgenes en órganos linfoides y permitir la supervivencia, proliferación y diferenciación de linfocitos T (Sun J et al, 2011; Koretzky G et al, 2010; Kobayashi K et al, 2012).

En el contexto molecular de las reacciones cutáneas severas adversas a medicamentos, el fármaco o sus metabolitos activos son reconocidos por las células APC y presentados a las células T para su reconocimiento y subsecuente generación de la activación antigénica. El primer cambio que se genera en el linfocito T es la activación del gen *C-FOS* que codifica la IL-2 (CD25) que favorece la supervivencia, proliferación y diferenciación del linfocito T, posteriormente el linfocito expresa moléculas de adhesión de tipo lectina transmembranal (CD 69) que favorecen el anclaje al tejido linfoide. Finalmente el linfocito T cumpliendo su función efectora provoca la destrucción de la célula diana por medio del proceso de degranulación donde se presenta la liberación de sustancias citotóxicas como perforina, granzima y granzulina entre otras (Janeway C et al, ed 2001).

Por lo anterior, se conoce que las proteínas granulares citotóxicas juegan un papel importante en la actividad que ejercen las células NK y CTLs. Estas células utilizan los mismos mecanismos para destruir la célula diana, pero diferentes vías de activación. Se debe tener en cuenta que la intensidad y la calidad de la activación y respuesta de las células citotóxicas CD 8+ y de células NK dependen de los microambientes, así como de las interacciones celulares (*Vivier E et al, 2008; Koretzky G, 2010*).

6.1.5 Mecanismos Genéticos de las RAM

La variación en el genoma humano es una causa importante de la variabilidad en la seguridad y eficacia de la respuesta farmacológica. La causa genética de la variabilidad interindividual de la respuesta a medicamentos ha sido explorada a través de la farmacogenética y la farmacogenómica. De manera fundamental los datos han permitido generar para algunos medicamentos algoritmos de dosificación basados en la información genética de los pacientes. Por consiguiente se espera obtener una mayor eficacia y seguridad en la dosificación farmacológica mediante la medicina personalizada (*Arribas I, 2010; Maggo SDS et al, 2016*).

Es claro que los determinantes de la respuesta a fármacos son factores que influyen en el desempeño de una sustancia en el organismo, como lo son aquellos propios del fármaco (presentación, dosis y vía de administración), los adquiridos por el paciente como las enfermedades hepáticas o renales entre otras y las inherentes al individuo como su material genético. Así partiendo de la premisa que la estructura genética del individuo tiene un papel determinante en la respuesta farmacológica a partir de un genotipo (*Arribas I, 2010*).

Por lo anterior la búsqueda en conocer el impacto causado por las variantes en el genoma en relación con la respuesta a fármacos, han generado el uso de técnicas moleculares y bioinformáticas que han permitido determinar su importancia y uso clínico. Es así como históricamente los efectos farmacogenéticos se han observado desde el año 510 A.C, cuando Pitágoras noto que la ingestión de habas causaba un cuadro de enfermedad aguda y el deceso en algunos individuos (*Maggo SDS et al, 2016*). Veinte siglos después se describieron algunas asociaciones entre fenotipos y alteraciones proteicas específicamente enzimas metabolizadoras, uno de los ejemplos es el defecto de la enzima Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa que se asocia con la anemia hemolítica tras el uso de primaquina y otros fármacos (*Maggo SDS et al, 2016; Wilke R et al, 2007*).

Hallazgos que se han podido determinar con técnicas tradicionales como la clonación funcional de genes, utilizando el conocimiento obtenido de proteínas purificadas y el análisis de genes candidatos asociado al fenotipo y las rutas metabólicas involucradas del fármaco. Sin embargo las RAM rara vez se asocian a la acción de un solo gen y la mayoría resultan de la interacción de factores genéticos y ambientales. Los primeros estudios genéticos en las RAM fueron la clonación e identificación del gen *CYP2D6* una enzima del complejo enzimático citocromo P450, que se encuentra implicada en el metabolismo de los esteroides y otros fármacos y constituye en 1.5 % del total de enzimas citocromo P450 (*Cozza K et al, 2001*).

En la última década las plataformas de análisis masivo como la secuenciación de siguiente generación (NGS) han permitido la evaluación de genes de forma simultánea. Uno de los estudios que permite identificar genes relacionados con rasgos complejos como son las RAM, son los de asociación del genoma completo (GWAS) que han permitido identificar

potenciales genes candidatos (*Maggo SDS et al, 2016; Cozza K et al, 2001*) y desde su aplicación se han descrito más de 300 genes que contribuyen a enfermedades multifactoriales (*Cozza K et al, 2001*). Dentro de las variantes específicas postuladas por estudios de GWAS asociadas a citotoxicidad y respuestas de hipersensibilidad se encuentran los loci del antígeno leucocitario (HLA) como el HLA*B15:02, que limita el uso de carbamazepina en pacientes portadores de este alelo que se ha asociado a la población Han del Noroeste de china (*Motsinger-Reif A et al, 2013; Kathleen M et al, 2016; Génin E et al, 2011*).

Recientemente el uso de redes de información, la recopilación de análisis de estudios GWAS y los estudios funcionales, han permitido conocer el mecanismo y el metabolismo de los fármacos, lo que permitió crear el proyecto PharmaGKB (*Pharmacogenomics Knowledge Base*) recurso importante como guía en el análisis de la selección y dosificación de fármacos (*Thorn C et al, 2013; <http://www.pharmgkb.org/>*). Actualmente se reconocen 625 genes asociados a procesos farmacogenéticos, 476 medicamentos con etiqueta de información farmacogenética aprobada por la FDA (Food and Drug Administration), se encuentran 96 guías para dosificación, 128 Rutas metabólicas descritas, 64 farmacogenes de particular relevancia en farmacogenómica, fármacos con anotaciones de variantes descritas 18.680 y con anotaciones clínicas (fenotipo) 3.384 (*Arribas I, 2010; <http://www.pharmgkb.org/>*). Las pautas de dosificación de medicamentos son expedidas por el consorcio de implementación de farmacogenética clínica (CPIC) y facilita la información de genes asociados con baja eficiencia, intolerancia, toxicidad o reacciones hipersensibilidad para el al clínico tratante (*Arribas I, 2010; Thorn C et al, 2013*).

En este momento la tecnología puede no ser un factor limitante para comprender los factores genéticos que influyen en las RAM; pero a menudo se dificulta por la información oportuna, el consentimiento y la recopilación de los sujetos para evaluar (*Maggo SDS et al, 2016*).

6.1.5.1 Farmacogenética

La farmacogenética es un área de trabajo de la farmacología y la genética, que se reconoció oficialmente hasta el año 1959 cuando se publicó el término “*Farmacogenética*” por el Alemán Friedrich Vogel, posterior a la observación de pacientes con porfiria secundario a la administración de fármacos (*Arribas I, 2010; Scott S, 2011*). Uno de los descubrimientos más influyentes para la farmacogenética y su utilidad clínica fue la identificación del citocromo P450 oxidasa complejo enzimático que controla en un gran porcentaje del metabolismo de los fármacos (*Scott S, 2011*).

Este campo relativamente nuevo nos permite abarcar la identificación de marcadores biológicos específicos que podrían estar asociados a la respuesta interindividual a un fármaco (*Scott S, 2011; Pirmohamed M, 2001*). En la respuesta farmacológica intervienen enzimas metabolizadoras, proteínas transportadoras, receptores y dianas terapéuticas, que pueden presentar variantes genéticas y condicionar la eficacia terapéutica y su toxicidad. La interacción de estos factores se evalúa en dos escenarios la farmacocinética y la farmacodinamia (*Arribas I, 2010; Phillips K et al, 2001; Drew L, 2016*).

6.1.5.1.1 Farmacocinética

La farmacocinética está relacionada con los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo (activación del pro fármaco) y eliminación. Eventos que se relacionan con las reacciones alérgicas de tipo A. Esta rama estudia el curso temporal de la concentración de

los fármacos en el organismo, con el fin de evaluar una acción terapéutica o tóxica; estas acciones van a depender de factores externos como la vía de administración, forma farmacéutica, dosis del fármaco y dosificación, que pueden llegar a ser modulados por variantes genéticas (*Pirmohamed M, 2001; Patil J, 2015*).

Uno de los ejemplos en farmacocinética son las enzimas metabolizadoras de fármacos, en los que una variante puede modificar funcionalmente la proteína codificada y encontrar pacientes con fenotipos diferentes en relación al metabolismo del fármaco encontrando pacientes metabolizadores lentos, normales, rápidos y ultrarrápidos. Las enzimas del citocromo P450 son una gran familia de enzimas metabolizadoras, la enzima CYP2D6 es una de las más caracterizadas por ser una de las principales enzimas catalizadores de drogas de uso psiquiátrico, neurológico y cardiovascular. Sin embargo en la actualidad se consideran otros polimorfismos asociados a otras enzimas como CYP2D9, CYP2C19, TPMT y VKORC 1 entre otras (*Brockmöller J et al, 2008*).

6.1.5.1.2 Farmacodinamia

La farmacodinamia está relacionada con el efecto del fármaco y no con su concentración, teniendo en cuenta la interacción del fármaco con su receptor y la eficiencia farmacológica. Esta rama estudia el mecanismo de acción de los fármacos, los efectos bioquímicos y fisiológicos. Así pretende determinar la interacción del fármaco a nivel molecular y las consecuencias de dichas interacciones evaluando afinidad y especificidad (receptor-fármaco) entre otras características. Este tipo de respuesta está asociado con reacciones alérgicas tipo B (*Drew L, 2016*). Un ejemplo en farmacodinamia son las variantes genéticas en el HLA-B que genera una susceptibilidad hasta de un 50 % de experimentar una reacción de hipersensibilidad cutánea severa (*Drew L, 2016*).

La identificación continua de genes relevantes, variantes y fenotipos asociados a la respuesta al fármaco, se facilitó por el proyecto del genoma humano que permitió obtener datos de las secuencias de interés, que indirectamente favoreció el inicio del campo de la farmacogenómica (*Patil J, 2015; Brockmüller J et al, 2008*).

6.1.5.2 Farmacogenómica

La farmacogenómica estudia la relación entre variantes genéticas y como el organismo responde a los medicamentos (*Arribas I, 2010*). Se relaciona con la evaluación de como los compuestos químicos modifican los patrones de expresión de genes en tejidos de interés y su posible asociación con características del fenotipo (*Pirmohamed M, 2001; Phillips K et al 2001; Drew L, 2016*). El objetivo de la farmacogenómica es la generación de nuevos fármacos con característica de seguridad, potencia, efectividad y costo beneficio para cada paciente según sus condiciones genómicas, así mejorando los costos en el sistema de salud (*Brockmüller J et al, 2008*).

En la actualidad se han asociado factores genéticos de susceptibilidad a las RAM, dentro de los descritos en la literatura con evidencia son los genes relacionados con el sistema inmunológico HLA-B del MHC clase I, que ha permitido identificar poblaciones asociadas a RAM con la administración de algunos fármacos y alelos específicos (*Brockmüller J et al, 2008*).

6.1.5.3 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)

El MHC, es una familia de genes que codifican proteínas de unión a membrana (glicoproteínas) llamados antígenos leucocitarios humanos o antígenos de histocompatibilidad (HLA). Estas moléculas tienen como función el reconocimiento y la

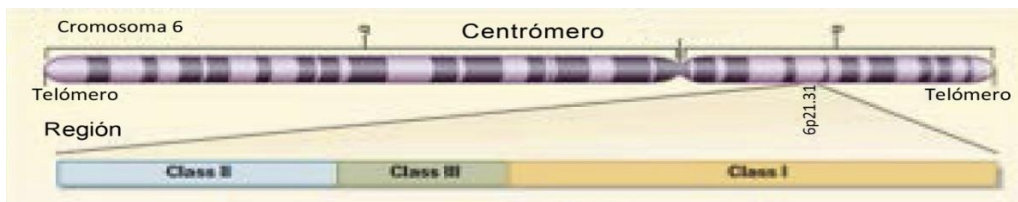
unión de fragmentos peptídicos denominados antígenos, derivados de patógenos, fármacos o alimentos, en la superficie celular para la posterior presentación a los linfocitos T permitiendo la activación del sistema inmune (*Goldberg A et al, 2015*).

El MHC tiene dos particularidades que dificultan evadir la respuesta inmune, el primero es que es poligénico, de modo que cada individuo posee un conjunto de moléculas con diferentes características de especificidad a péptidos y la segunda es que es altamente polimórfico, puesto que cada gen tiene diferentes variantes o alelos que se pueden expresar de manera codominante. Estas características le permiten tener mayor capacidad de respuesta, con rasgos interindividuales específicos frente a inmunógenos (*Goldberg A et al, 2015; Vandiedonck C et al, 2009*).

6.1.5.3.1 Características Genéticas

En humanos el MHC, es una región localizada en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) que abarca 4Mb y codifica más de 200 genes. Estos genes están dispuestos en tres grupos (clase I, II y III) teniendo en cuenta su función inmunológica y su estructura proteica (*Xian C et al, 2010*). En la región más cercana al centrómero se ubican los genes de clase II y en la región más próxima al telómero se encuentran los genes de clase I, que codifican glicoproteínas de unión a membrana. Entre estas dos regiones se sitúan los genes de clase III que codifican proteínas del sistema del complemento, citoquinas y proteínas de choque térmico como se observa en la (figura 7) (*Vandiedonck C et al, 2009; Xian C et al, 2010*).

Figura 7. Localización genes HLA, Tomado y modificado (Lai A et al, 2008)



6.1.5.3.1.1 Genes Clase I

Los genes clase I codifican glicoproteínas de anclaje que se expresan en todas las células nucleadas, con una menor expresión en los monocitos, hepatocitos y neuronas. Dentro de esta familia de genes se encuentran dos grupos, los clásicos y los no clásicos. En el primer grupo se encuentran el HLA-A, HLA-B y HLA-C, que son altamente polimórficos para las cuales se han descrito más de 3.000 alelos para cada uno y en el segundo grupo los no clásicos se encuentran HLA-E, HLA-F, HLA-G y HLA-E que se expresan en tejidos celulares más específicos, como la expresión de HLA-G en el citotrofoblasto fetal (Vandiedonck C et al, 2009; Klein J et al, 2000).

Figura 8. Región genes clase I, Tomado y modificado (Klein J et al, 2000)



En la región codificante de los genes clase I, el exón 1 codifica el péptido líder, el exón 2 y el exón 3 codifican los dominios α 1 y α 2, el exón 4 codifica dominio α 3, el exón 5 codifica la región transmembranal y los exones 6 y 7 la cola citoplasmática. Los polimorfismos en el exón 2 y 3 son los responsables de la especificidad de unión al péptido, ya que corresponden al sitio de reconocimiento del antígeno (Sung Y, 2007).

Genes que han relacionado con RAM cutáneas, específicamente los alelos del loci HLA-B.

6.1.5.3.1.2 Genes Clase II

Los genes de clase II codifican proteínas de anclaje a membrana que se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos como células dendríticas, macrófagos, células langerhans, células kupffer, linfocitos B y linfocitos T activados. En esta familia encontramos también dos grupos, las moléculas clásicas HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP y las no clásicas HLA-DM y HLA-DO. En esta región también se encuentran genes que codifican moléculas, que participan en el procesamiento del antígeno como TAP y Tapasin (*Klein J et al, 2000; Sung Y, 2007*).

Figura 9. Región genes clase II, Tomado y modificado (*Klein J et al, 2000*)



6.1.5.3.1.3 Genes Clase III

Los genes de clase III, codifican proteínas que desempeñan funciones inmunológicas como las interleuquinas, las proteínas de choque térmico y componentes del sistema del complemento (*Klein J et al, 2000; Sung Y, 2007*).

Figura 10. Región genes clase III, Tomado y modificado (*Klein J et al, 2000*)



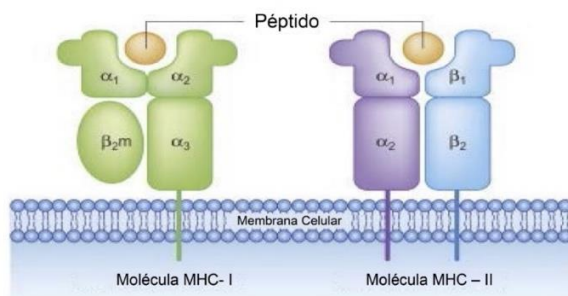
6.1.5.3.2 Productos Proteicos MHC

Los genes que comprenden el MHC, codifican diferentes tipos de proteínas, productos proteicos transmembranales que se expresan en todas las CTLs y favorecen una respuesta inmunológica específica.

6.1.5.3.2.1 Moléculas MHC I

Los antígenos de clase I son heterodímeros $\alpha\beta$ glicosilados. Su estructura se caracteriza por una cadena pesada (α) que pesa 45 kDa caracterizada por tener tres dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de aproximadamente de 90 aminoácidos cada uno. Presenta un dominio transmembranal, un dominio citoplasmático y una cadena liviana de unión a una proteína monomórfica (β_2m) microglobulina de 12 kDa, que es codificada en el cromosoma 15. Esta proteína cumple la función de estabilizar el plegamiento de la cadena pesada por medio de un enlace no covalente con los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (figura 11) (Sung Y, 2007; Galindo I et al, 2017).

Figura 11. Estructura Moléculas MHC I – II, Tomado y modificado (Klein J et al, 2000)



Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ cumplen la función de unión al péptido antigénico de aproximadamente 8 a 10 aminoácidos y unión al receptor TCR $\alpha\beta$. El dominio $\alpha 3$ se caracteriza por su alta conservación ya que facilita el reconocimiento de la molécula CD 8

de la membrana de los linfocitos T CD 8+ por medio de su correceptor (*Sung Y, 2007; Galindo I et al, 2017*).

La función principal de estas moléculas, es el reconocimiento y la presentación a los linfocitos T citotóxicos (CD 8+), de péptidos derivados de la degradación de proteínas citosólicas para desencadenar y amplificar una respuesta inmunológica (*Sung Y, 2007; Galindo I et al, 2017*).

6.1.5.3.2.2 Moléculas MHC II

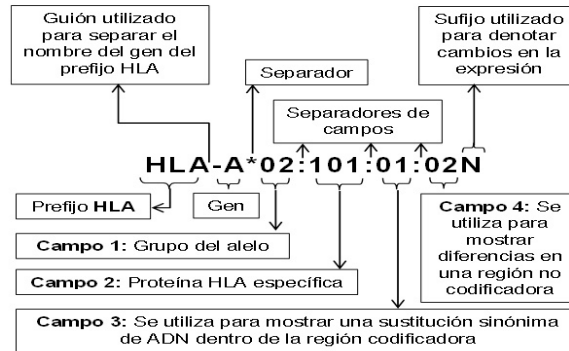
La expresión de estas moléculas es más restringida y se caracterizan por ser constitutivas en las células APC. La función principal de estas moléculas es el reconocimiento de moléculas extracelulares que se realiza por medio de la fagocitosis de proteínas y los fragmentos peptídicos que se reconocen uniéndose al HMC clase II antes de la superficialización para la presentación a los linfocitos T colaboradores CD 4+ y linfocitos citotóxicos CD 8+ (*Vandiedonck C et al, 2009; Sung Y, 2007; Galindo I et al, 2017*).

Esta glicoproteína es un heterodímero formado por una cadena α y una cadena β , se caracteriza por cuatro dominios. La cadena α consta de dos dominios globulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$, la cadena β dos dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ (figura 11). Los dominios superficiales $\alpha 1$ y $\beta 1$ interaccionan mediante uniones no covalentes con los péptidos antigénicos de 15 a 25 aminoácidos, derivados de la degradación intracelular por vía endocítica de proteínas exógenas (*Vandiedonck C et al, 2009; Sung Y, 2007; Galindo I et al, 2017*).

Debido a que el MHC es altamente polimórfico, en la actualidad se describen un gran número de alelos HLA clásicos y no clásicos, esto llevo a la introducción de una nueva clasificación en el 2010 Figura 13, permitiendo la tipificación y caracterización con una numeración

infinita, determinada por el comité de nomenclatura para los factores del sistema HLA constituida por la OMS/WHO (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>).

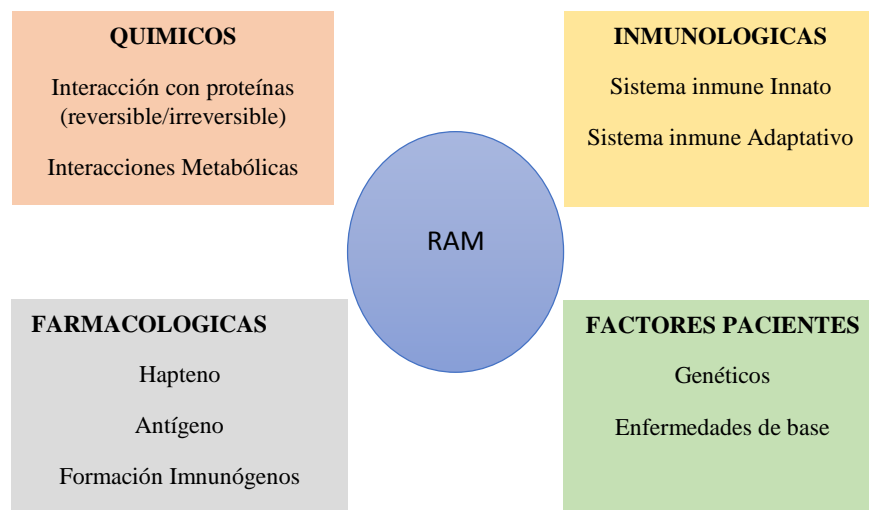
Figura 12. Clasificación HLA, Tomado y modificado (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>)



Esta clasificación permite almacenar sistemáticamente, el gran número de variantes en la secuencia de DNA de los alelos HLA, generando diferentes frecuencias a nivel poblacional que han permitido identificar la asociación de algunos alelos con enfermedades y en este caso con la administración de fármacos (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>).

Por lo anterior se entiende que las reacciones adversas a medicamentos es la respuesta final de la interacción de diversos sistemas biológicos quienes según activación, expresión y participación manifiestan un patrón clínico característico.

Figura 13. RAM, Interacción de Sistemas Biológicos, Tomado y modificado (Werner J et al, 2011)



6.1.5.3.3 Asociación MHC y las Respuestas de Hipersensibilidad

En las reacciones de hipersensibilidad a fármacos, las moléculas del MHC clase I y clase II, juegan un papel importante en la activación de la respuesta inmune, específicamente la región más polimórfica del HLA, identificada como el locus HLA-B que se ha relacionado con reacciones cutáneas severas (*Vandiedonck C et al, 2009; Galindo I et al, 2017*).

En la literatura los síndromes de hipersensibilidad a fármacos asociados a HLA, se reportan desde los 80's, donde se describen reacciones retardadas cutáneas a las aminopenicilinas y reacciones cutáneas al alopurinol en poblaciones al sur de china. En los años 90's, se realiza la clasificación y datos epidemiológicos de las reacciones adversas cutáneas graves (SCAR), y se observó una asociación del HLA-DRB1*1501 con la administración de amoxicilina-clavulanato (*Sung Y, 2007; Galindo I et al, 2017*).

Los alelos del HLA clase I, como el HLA-B*57:01, HLA-B*15:02 y HLA-B* 58:01 entre otros, se han relacionado con la susceptibilidad de presentar reacciones cutáneas severas tipo Síndrome Stevens Johnson (SJS) y Necrólisis Epidérmica Tóxica (NET) tras la administración de algunos fármacos (*Thomson G, 1991; Daly A, 2013; Li L et al, 2013*).

En el año 2002 se describe la relación entre la administración de inhibidor de la transcriptasa inversa “abacavir”, con el alelo HLA-B*57:01, asociación descrita en población caucásica, encontrando que entre el 5% y el 8% de los pacientes tratados presentaban una hipersensibilidad inducida. En la población africana y japonesa no se encontró una frecuencia tan alta (*Daly A, 2013; Zhong J et al, 2011*).

La asociación entre HLA-B*15:02 y fenotipo SJS/ NET, se describe en el 2004 por Chung, en población chinos Han de Asia oriental tras recibir un anticonvulsivante aromático

“carbamazepina” (*Li L et al, 2013*). La frecuencia más alta observada de este alelo fue en población del sudeste asiático que en las poblaciones japonesas y caucásicas donde no se observó la asociación con el alelo HLA-B*15:02 y SJS/NET inducido por fármacos (*Thomson G, 1991; Ronaldson K et al, 2009*).

Las RAM inducidas por inhibidores de la xantino oxidasa “alopurinol” se asoció con la presencia del alelo HLA-B*58:01 en población de chinos Han, población caucásica y japoneses, con diferentes frecuencias alélicas según la etnia. Este hallazgo podría enmarcar al alelo HLA-B*58:01 como un posible biomarcador (*Faviel F et al, 2011; Sánchez et al, 2014*).

A pesar de que estos estudios visualizan los alelos del HLA-B, como posibles biomarcadores, la extensión de la asociación del genotipo con la fuerte relación a la administración de fármacos y el fenotipo SJS y NET no es concluyente y evidencia diferentes frecuencias alélicas a nivel poblacional para diferentes fármacos desencadenantes (*Daly A, 2013; Masahiro T et al, 2010; Pavlos R et al, 2012*).

En el año 2011 se realizó un GWAS con el fin de identificar variantes asociadas a RAM cutáneas severas, donde se evaluaron 424 pacientes europeos con fenotipo SJS, SJS/NET y NET, secundarias a la administración de carbamazepina, fenitoína o alopurinol fármacos previamente descritos y 1881 individuos no relacionados y sanos denominados controles. En este estudio se confirma la participación de variantes genéticas localizadas en la región HLA y fenotipo inicial, especialmente en asociación con alopurinol en población europea (*Génin E et al, 2011*).

Lo expuesto anteriormente, deja claro la asociación entre las reacciones de hipersensibilidad tipo A o B, con el MHC tipo I y tipo II. Sin embargo su participación no es única, estos escenarios son el resultado de la interacción de diferentes moléculas y células del sistema inmunitario quienes favorecen una respuesta autoinmune, donde la sumatoria de sus alteraciones llevaran posiblemente a un fenotipo más severo (*Pavlos R et al, 2012*).

6.1.6 Fenotipo de las RAM cutáneas

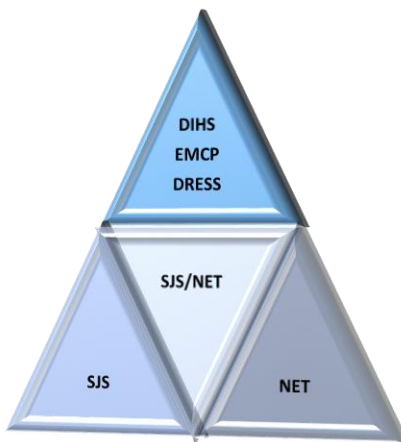
La piel, es considerada uno de los tejidos de mayor extensión y es el principal órgano comprometido en las RAM. Actúa como una barrera física y mecánica con función protectora contra agentes externos. Una de sus principales características es su actividad bioquímica caracterizada por una actividad metabólica facilitada por isoenzimas de la familia CYP450, enzimas activas para el metabolismo de fármacos y otras moléculas (*Rivera C et al, 2008; Hans F et al, 2009*). La capacidad metabólica de un tejido se encuentra ligada al número y tipo de enzimas responsables de la bioactivación, proceso que genera la posibilidad de que se formen sustancias reactivas intermedias capaces de activar a las células APC y desencadenar una respuesta inmunológica mediada por linfocitos T citotóxicos (*Rivera C et al, 2008; Hans F et al, 2009*).

Por lo tanto, la piel debe ser evaluada como un órgano complejo, dinámico y con funciones inmunológicas, características descritas desde el año 1970 por Fichlelius quien lo describe como “Órgano Linfoide” (*Rivera C et al, 2008*). Esta particularidad es el resultado de diferentes patrones morfológicos en su estructura, característica que le confiere la capacidad de responder a varios estímulos, lo que dificulta que en la clínica sea evidente la identificación del mecanismo causal involucrado (*Hans F et al, 2009; Joseph Y et al, 2007*).

La principal célula en la piel es el queratinocito, un 90 % de ellos se encuentran en la epidermis. Estas células cumplen una función metabólica con capacidad de absorción, biotransformación y transporte, características dadas por las diferentes isoformas de la enzima CYP450, que se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplásmico CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6 y CYP3A5 son enzimas exclusivas de la piel (*Hans F et al, 2009; Rendic S et al, 1997*).

Dentro de las RAM dermatológicas se presentan diferentes espectros clínicos e histopatológicos, los cuales se desencadenan de forma temprana o tardía posterior a la ingesta al fármaco (*Park B et al, 2001*). Por lo anterior se han descrito diferentes fenotipos clínicos como hipersensibilidad inducida por fármacos (DIHS), exantema maculo papular (EMCP) y síndrome de sensibilidad a drogas con eosinofilia y síntomas sistémicos (DRESS), estas reacciones no deseadas son reversibles y de fácil manejo clínico. Otro grupo de las RAM son las potencialmente letales por consiguientes se consideran respuestas no deseadas graves, en esta categoría se han descrito SJS, el solapamiento del fenotipo SJS/NET y NET (*Torre C et al, 2013; Roujeau J et al, 1994*).

Figura 14. Espectro Fenotípico de las RAM cutáneas.



Como se ha mencionado existen factores particulares que aumentan el riesgo de susceptibilidad a las reacciones adversas como los, genotipos acetiladores lentos, la inmunosupresión y la poliformulación entre otros, para desarrollar una RAM cutánea (*Park B et al, 2001*).

6.1.6.1 Síndrome Stevens Johson y Necrólisis Epidérmica Toxica (SJS/NET)

El SJS y NET son enfermedades mucocutáneas poco frecuentes pero potencialmente mortales, que predominan como reacciones adversas a medicamentos (*Roujeau J et al, 1995*). El termino Stevens Johnson se describe en el año 1922 por dos pediatras estadounidenses “Stevens y Johson” quienes realizan una descripción fenotípica de la entidad, posteriormente en 1956 se introduce el termino Necrólisis Epidérmica Toxica por Lilley, que describe un trastorno clínico relacionado con la destrucción extensa de la epidermis (*Roujeau J, 2013*). Sin embargo en la actualidad estos dos trastornos SJS/ NET son considerados realmente un espectro clínico que varía en la extensión y la severidad del compromiso epidérmico, pero tienen una patología y etiología común (*Sung Y, 2007*).

Las tasas de incidencia del SJS/ NET oscilan entre el 1.4 a 12.7 % de casos por millón por año (*Stern R et al, 2017; Frey N et al, 2017*). Intervalo obtenido de diferentes estudios, uno de ellos un estudio trasversal de SJS/NET entre el año 2009 a 2012 en norte américa que observo 12,7 de casos por millón por año en adultos que es el más alto hasta le fecha reportado (*Frey N et al, 2017; Hsu D et al, 2016*), otro estudio en corea calculo una incidencia de 5,9 casos por millón por año estudio realizado entre el año 2010 a 2013 (*Frey N et al, 2017; Yang M-S et al, 2016*). En Europa un estudio observacional planteado entre el año 1995 a 2013 reportó 5,76 de casos por millón por año, que es más bajo que en norte américa (*Frey*

N, et al 2017). Esta discrepancia puede suponerse es debido a un mayor consumo de fármacos en relación con otros países y una mayor población afro descendiente y asiática.

Todos estos datos se logran por las grandes bases de datos en línea, que permiten la notificación de dicha entidad por parte del servicio de salud. Cabe anotar que en Colombia no disponemos de estudios de incidencia. Sin embargo se han hecho descripciones de casos clínicos aislados uno de ellos realizado por *Rojas C, et al*, en una institución de salud de III nivel de complejidad con el objetivo de determinar la prevalencia de las RAM en pacientes que ingresan al servicio de urgencias (*Rojas C et al, 2013*).

La mayoría de estas reacciones cutáneas severas son inducidas por fármacos (70 %) (*Roujeau J, 2013; Roujeau J et al, 2011*), estudios observacionales identifican a los agentes antiepilépticos como la carbamazepina, los agentes inhibidores de la xantina oxidasa como el alopurinol, inhibidores de la transcriptasa inversa como el abacavir y ciertos antibióticos como aquellas moléculas con mayor riesgo de una reacción adversa a medicamentos (*Stern R et al, 2017; Frey N et al, 2017*).

6.1.6.1.1 Clínica

El SJS/NET es de naturaleza idiosincrática y pueden afectar a cualquier individuo que consuma medicamentos (*Lars E, 2006*). Inicialmente el cuadro clínico se presenta con síntomas y signos inespecíficos como fiebre, prurito generalizado, odinofagia, mialgias, artralgias y adenopatías entre otras, en un periodo de 1 a 2 semanas. Las lesiones en la piel suelen aparecer inicialmente en el tronco, extendiéndose a cara, cuello y extremidades superiores proximales, las distales suelen estar menos afectadas excepto las palmas y las plantas. Las lesiones de la mucosa oral, ocular y genital se presentan en el 90 % de los

pacientes afectados, el 25 % afecta el tracto respiratorio y en menor porcentaje el gastrointestinal (*Lars E, 2006; Carle P et al, 1996; Stern R, 2000*).

La morfología de las lesiones en la piel, se describen como lesiones maculopapulares eritematosas de color rojizo a purpúrico de tamaño y forma irregular. A medida que las lesiones progresan estas tienden a coalescer facilitando el desfacelamiento de la capa epidérmica, proceso secundario a la apoptosis masiva de los queratinocitos que genera acumulación de líquido pro inflamatorio formando en las flictenas que se extienden en la superficie corporal. Entre mayor compromiso cutáneo presente el paciente mayor riesgo de morbimortalidad, caracterizado como un compromiso menor al 10 % es leve (SJS), compromiso entre el 10 % al 30 % es moderado (SJS/NET) y mayor al 30 % es grave (NET) (*Lars E, 2006; Roujeau J et al, 1990; Chung W et al, 2012*).

Actualmente en la práctica clínica las RAM se evalúan aplicando 7 criterios clínicos y paraclínicos (superficie de área corporal afectada, edad, malignidad, taquicardia, urea sérica, glucosa sérica y bicarbonato) evaluado en un sistema de puntuación que permite predecir el riesgo de mortalidad para el paciente llamado SCORTEN (*Roujeau J et al, 2011; Lars E, 2006*).

6.1.6.1.2 Fisiopatología

El daño epidérmico es una secuencia de eventos moleculares y celulares que conducen al desarrollo de fenotipo SJS, SJS/NET y NET, cuyas manifestaciones clínicas son resultado de un proceso apoptótico que implican vías intrínsecas y extrínsecas (*Tohyama M et al, 2012*).

Los factores intrínsecos hacen referencia a los metabolitos electrofílicos de los fármacos que pueden causar de forma directa daño a nivel mitocondrial aumentando las especies reactivas

(ROS) que pueden inducir a la producción de interleuquinas pro inflamatorias como factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF alfa) e inducir a muerte celular programada (*Tohyama M et al, 2012; Paul C et al, 1996*).

Los factores extrínsecos, están asociados con la interacción de receptores y ligandos de muerte (Fas/FasL) conocidos como inductores de apoptosis. Otro de los factores extrínsecos son las proteínas citotóxicas que se encuentran a nivel granular en las células efectoras CTLs y NK como la perforina, la granzima y la granulisina que desencadenan la apoptosis en los queratinocitos (*Zhong J et al, 2011; Sánchez A et al, 2014*). El estudio del líquido extravasado entre la dermis y la epidermis realizado por *Chung W et al 2008*, evidencio infiltración de linfocitos T CD8+ y células NK como las principales células efectoras y las moléculas con mayor especificidad para el fenotipo a estudio (*Chung W et al, 2008; Chung W et al, 2012; Tohyama M et al, 2012*).

6.1.6.2 Moléculas Citotóxicas en SJS/ NET

La función citotóxica es una actividad fundamental del sistema inmunológico, que está constituido por un modelo multifactorial organizado y ejecutado por diferentes células efectoras como T CD 8+ y NK que secretan proteínas con función lítica, con el único fin de inducir muerte celular a través de la citólisis y la fragmentación del DNA (*Tohyama M et al, 2012*).

Fas – FasL

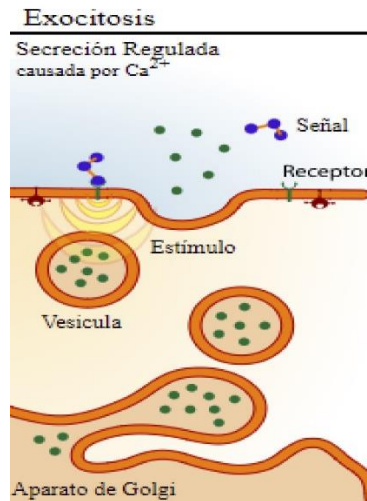
La molécula de FasL se expresa en la superficie de los linfocitos T citotóxicos y al realizar la interacción con su receptor que esta expresado en el queratinocito desencadena el proceso de apoptosis. En los estudios de *Murata et al 2008* y *Chung en el 2008* observaron que los

niveles de FasL eran altos en los primeros 5 días o sea en la fase temprana, pero posterior a la fase inicial se observó un descenso progresivo. También se describió que se encuentra presente y elevada en todas las lesiones cutáneas secundarias a fármacos, considerando la interacción Fas – FasL no específica para el fenotipo SJS, SJS/NET y NET, pero de vital importancia en la etapa inicial en la apoptosis en los queratinocitos (*Chung W et al, 2012; Murata J et al, 2008*).

6.1.6.2.1 Proteínas Citóxicas

Las proteínas citotóxicas asociadas al fenotipo a estudio se liberan al medio extra o intracelular por medio de una vía dependiente de exocitosis; vía que se establece a través de señales intracelulares, posteriores al reconocimiento de la célula diana por el linfocito T citotóxico o la célula NK. La exocitosis es un proceso que comprende diferentes fases, entre ellas la translocación de la vesícula del aparato de Golgi a la membrana plasmática, el reconocimiento de la zona activa en la membrana que permite el acople de la vesícula llamado “*docking*” para la preparación o activación de las vesículas fenómeno llamado “*priming*”, que facilita la fusión de las dos membranas, facilitando así la liberación del contenido intravesicular. La descripción de estas fases hacen que la exocitosis no se ha del todo un proceso difusional si no que es regulado por distintos complejos proteicos (figura 15) (*Verhage M et al, 1995*).

Figura 15. Vía de Exocitosis celular, Tomado y modificado (Verhage M et al, 1995).



La vía dependiente de exocitosis es un mecanismo que protege a la célula secretora de la autodestrucción, por medio de la formación de vesículas o gránulos donde se encuentran reclutadas las proteasas en una forma inactiva. Para estimular esta vía se requiere de la interacción célula efectora – célula diana para la activación de proteínas intracelulares que favorecen la movilización de microtúbulos quienes permiten el desplazamiento de los gránulos preformados al sitio de interacción célula – célula, logrando la polarización del gránulo para su posterior degranulación o liberación. Sin embargo se debe tener en cuenta que ni la polarización ni la degranulación efectiva son suficientes para una lisis eficaz de la célula diana, ya que depende de la calidad de la proteína proteolítica secretada y su interacción con proteínas intracelulares (Paul C et al, 2008; Murata J et al, 2008).

En la apoptosis las moléculas citotóxicas comúnmente descritas son la perforina, granzima y FasL, sin embargo el estudio de Chung W et al del 2008, en líquido de flictenas de pacientes con diagnóstico de SJS/SJS/NET y NET demostró que otra de las proteínas previamente descrita en la literatura, la granulisina era clave para la apoptosis de los queratinocitos,

describiéndola como una proteína específica de esta entidad ya que al observar la expresión de proteínas en el tejido por medio de inmunohistoquímica, la granulicina solo se expresaba en el tejido de pacientes con SJS, SJS/NET y NET (Chung W et al, 2012; Paul C et al, 1996; Murata J et al, 2008).

6.1.6.2.1.1 Perforina

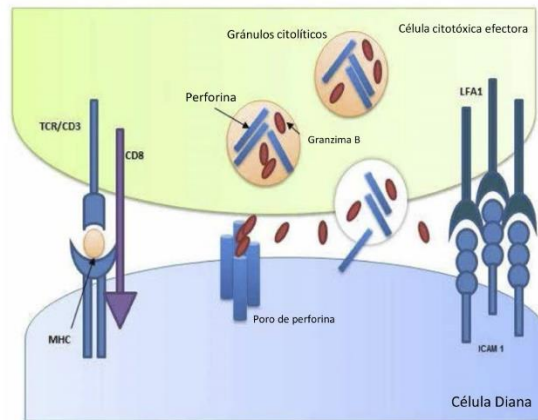
Esta molécula fue la primera proteína aislada en gránulos lúcticos descrita en 1988 y nuevamente en el año 2010 por la universidad de Monash, como una glicoproteína de 70 kDa con 4 dominios estructurales, 2 dominios N-terminal y 2 C-terminal, con una región hidrófoba que le permite interactuar e incorporarse a la membrana bilipídica de la célula diana; permitiendo la formación de canales o poros de aproximadamente de 5 a 20 nm de diámetro favoreciendo el acceso intracelular a otras moléculas lúcticas. Su localización es intragranular en forma de monómeros solubles (Chau L et al, 1995; Osínska I et al, 2014).

El mecanismo de acción de la perforina depende directamente de la incorporación y la polimerización de los monómeros en membrana celular de la célula blanco. Estos procesos dependen de varios factores, uno de ellos es la participación de la proteína calreticulina, una enzima que se encuentra en los gránulos citolúcticos y sirve como una proteína chaperona de la perforina manteniéndola plegada e inactiva en la célula efectora (Osínska I et al, 2014; Voskoboinik I et al, 2006).

La perforina interactúa con la célula diana a través de su dominio central hidrófobo que se une a los fosfolípidos de la membrana, el extremo N-terminal tiene un sitio de unión al calcio que le permite la interacción con el ion para su desplegamiento, aumentando así su afinidad y la formación del canal. Los poros formados por la perforina alteran la estructura de la

membrana celular favoreciendo el flujo pasivo de agua, enzimas y la liberación no selectiva de moléculas, que tiene como causa inducir lisis osmótica y activar las vías proapoptóticas (figura 16) (Osińska I et al, 2014; Voskoboinik I et al, 2006).

Figura 16. Mecanismo de acción de la perforina, Tomado y modificado (Osińska I et al, 2014)



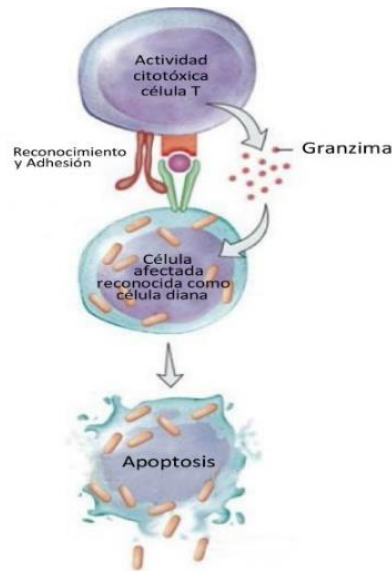
La perforina es una proteína de acción membranolítica que juega un papel importante en la actividad citotóxica mediada por T CD 8+ y células NK, dado que facilita el paso de moléculas granulares como granzima y granulisina (Voskoboinik I et al 2015; Cullen S et al, 2008).

6.1.6.2.1.2 Granzima

La granzima, es una proteína soluble de estructura globular que se encuentra en forma zimógena y pertenece a la familia de las serina – proteasas, que se diferencian por su acción en el sustrato específico. Estas enzimas tienen la capacidad de escindir enlaces peptídicos activando o degradando proteínas citosólicas o de membrana. Esta molécula es la más abundante en los gránulos citotóxicos y trabaja de forma conjunta con la perforina, quien facilita su paso al citosol en la célula diana (figura 17). Sin embargo su actividad citotóxica

puede ejercerse también por interacciones electrostáticas con la membrana celular (Cullen S et al, 2008; Trapani J, 2001; Bots M et al, 2006).

Figura 17. Actividad citotóxica mediada por granzima, Tomado y modificado (www.uaz.edu.mx)



Estas proteasas se pueden agrupar en tres subfamilias de acuerdo a la especificidad del sustrato, la primera se caracteriza por su actividad enzimática similar a la quimiotripsina como la granzima B y H que tienen como función activar la caspasa 3 por clivaje y alterar la integridad de la membrana mitocondrial por activación de Bid entre otras, así induciendo la apoptosis. La segunda subfamilia es la granzima con actividad similar a la tripsina como la granzima A y K que tienen como función atacar la histona 1 (H1) e inducir DNAsas que fragmentan el DNA y la familia de las metasas que se caracterizan por el clivaje de enlaces peptídicos detrás de la región hidrófoba específicamente en el aminoácido metionina más cerca de la proteína objetivo. La expresión de la familia de granzimas es restringida a los linfocitos T activos, células T inmaduras en timo, linfocito T $\gamma\delta$ y a las células NK, que han tenido exposición a un antígeno (Trapani J, 2001; Bots M et al, 2006).

La granzima B es la más abundante y con la actividad apoptótica más fuerte de todas las granzimas, su función es la inducción de la apoptosis por dos mecanismos principales, el primero es por la activación de la caspasa 3 quien se encuentra de forma inactiva en el citosol como procaspasa 3 y se hidroliza para activarse generando la permeabilidad de la membrana nuclear y la degradación del DNA nuclear por medio de la fragmentación del inhibidor de la DNAsa (ICAD). El segundo mecanismo se genera por el aumento de la permeabilidad mitocondrial secundaria a la activación de Bid, molécula que hace parte de la familia Bcl-2, que induce liberación del citocromo - C mitocondrial, que a su vez activa la caspasa 9 y aumenta la actividad de caspasa 3 llevando a la muerte celular (*Trapani J, 2001; Chowdhury D et al, 2008*).

Inicialmente en las respuesta de citotoxicidad las moléculas mejor descritas y conocidas eran Fas/FasL, perforina y granzima proteínas anteriormente descritas sin embargo algunos estudios como el de *Chung W et al* en el 2008, describe que estas moléculas no son específicas de SJS, SJS/NET y NET ya que su expresión se presenta en otras patologías cutáneas secundarias al consumo de fármacos, postulando a la granzima como una molécula específica de este fenotipo (*Chowdhury D et al, 2008; Shih C et al, 2014*).

6.1.6.2.1.3 Granzima

La granzima también conocida como linfoquina LAG-2, proteína NKG5 o proteína activada por células T- TLAS519, es una proteína citotóxica granular, identificada en el año 1987 a partir del mRNA de linfocitos T humanos (*EMBL-EBI; Clayberger C et al, 2003*). Se expresa de forma constitutiva en células NK y células T $\gamma\delta$ y a diferencia de otras proteínas citotóxicas como perforina y granzima, la granzima se expresa en células T $\alpha\beta$ (TCD8+) posterior a la activación antigénica. Estas células se caracterizan por su función efectora clave

en la muerte celular, fisiopatología relacionada con el SJS, SJS/NET y NET (*Clayberger C et al, 2003; Villamor N, 2004*).

La granulinsina es codificada por el gen *GPLY* que está localizado en el cromosoma 2p11.2 y está constituido por 5 exones codificantes con una longitud de 846 pb. Inicialmente se sintetiza un producto proteico de 145 aminoácidos con un peso molecular de 15 kDa de localización citoplasmática que se transporta a los gránulos citotóxicos, donde sufre una modificación postraduccional dada por un clivaje proteico en el N - C terminal. Consecuentemente, se obtiene un producto proteico de menor tamaño de 130 aminoácidos con un peso molecular de 9 kDa, esta proteína es una molécula con características de mayor citotoxicidad. Se describe que su clivaje se realiza en los gránulos citoplasmáticos, pero es inhibido cuando se aumenta el pH, secundario a la presencia del inhibidor de H⁺ ATPasa con canamicina A, teoría que probablemente explique por qué la granulinsina de 9 kDa no causa autolisis (*Hanson D et al, 1999; Krensky A et al, 2009*).

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| MATWALLLLA | AMLLGNPGLV | FSRLSPEYYD | LARAHLRDEE | KSCPCLAQEG |
| 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| PQDLLTKTQ | ELGRDYRTCL | TIVQKLKVM | DKPTQRSVSN | AATRVCRTGR |
| 110 | 120 | 130 | 140 | |
| SRWRDVCNRF | MRRYQSRVTQ | GLVAGETAQQ | ICEDLRLCIP | STGPL |

Figura 18.

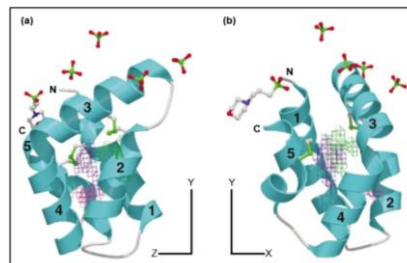
Secuencia de aminoácidos
proteína granulinsina de 15 kDa.

www.uniprot.org/

El análisis de este péptido por medio de estructura cristalina en el 2005 (*Anderson D et al, 2003; Nagasawa M et al, 2014*) sugiere que consta de 5 hélices α , con 3 dominios funcionales conformados por 5 cisteínas, 12 argininas y 3 lisinas, que la identifica como una proteína catiónica caracterizando los dominios funcionales de unión a membrana (figura 19). Esta particularidad le confiere una similitud con las proteínas de la familia tipo SAPLIP (saposin

protein – like) con una homología cercana al 30 % y una similitud de 66 % (Roujeau J et al, 2011); según Bruhn estas proteínas son capaces de interactuar con lípidos de la membrana celular favoreciendo la perturbación de la estructura y alterando la permeabilidad de la misma. En la literatura se describen más de 235 proteínas evolutivamente conservadas con homologías entre un 25 % a 30 %, pero con estructuras similares en sus dominios funcionales caracterizados por aminoácidos de carga positiva e hidrofóbicos que facilita su interacción (Nagasawa M et al, 2014).

Figura 19. Estructura de la proteína granulinsina, Tomado (Stern R 2000)

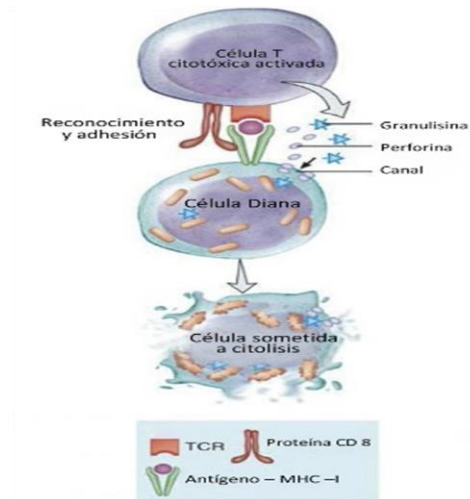


Este péptido actúa por medio de la vía degranulación dependiente de exocitosis y se presenta en dos escenarios según la célula efectora, esto le permite obtener una respuesta específica con la activación antigénica de los CTLs/CD 8+ o una respuesta inespecífica regulada por las células NK (Nagasawa M et al, 2014; Kresnsky A et al, 2005).

La respuesta específica esta mediada por los CTLs que dependen del reconocimiento e interacción del receptor de HLA – I con el receptor de membrana TCR $\alpha\beta$ presentando el antígeno, este receptor se encuentra acompañado de la proteína CD 8 que asiste el reconocimiento y la adhesión de la interacción celular. Esta activación antigénica favorece la expansión clonal de los CTLs /CD 8+ que permite la amplificación de la respuesta

inmunológica y la generación de señales intracelulares citotóxicas que activan la degranulación (figura 20) (Kresnsky A et al, 2005; Takamori Y et al, 2005).

Figura 20. Actividad citotóxica de la granulicina mediada por CTLs, Tomado y modificado (www.uaz.edu.mx)



La respuesta inespecífica es mediada por las células NK, que reconocen a la célula diana por la falta de expresión en su membrana de MHC-I o por alteraciones morfológicas que favorecen el reconocimiento por el sistema como deletéreas. Cuando la célula diana expresa la molécula de MHC-I, las células NK son inhibidas por el receptor inhibitorio que expresan en su membrana que le permite reprimir la activación de una respuesta inmune (figura 21) (Kresnsky A et al, 2005).

Figura 21. Actividad citotóxica de la granulinsina mediado por células NK, Tomado y Modificado (Gismondi A et al, 2010)

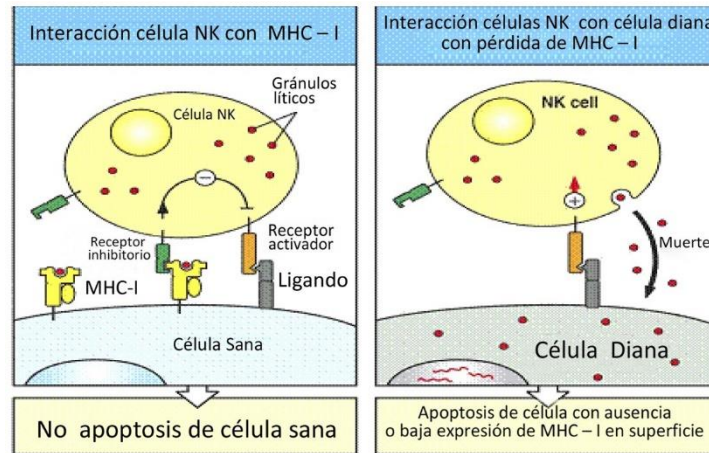


Fig 22. Las células NK, no atacan cuando la célula diana presenta en la superficie MHC-I por el reconocimiento de su receptor inhibitorio. En caso de perder la expresión de MHC-I se inicia interacción inicialmente Fas/FasL y activación de la vía de degranulación.

Las células NK establecen dos tipos de interacciones, la primera es electrostática que es facilitada por la carga positiva de los dominios funcionales de la proteína, unión generada en su mayoría por la arginina que interactúa con la carga negativa de la membrana celular, la segunda interacción es por medio del proceso de adhesión célula – célula atribuida a la integrina $\beta 2$ y la proteína ICAM1 que se caracterizan por formar heterodímeros capaces de generar señales intracelulares que contribuyen a cambios en la conformación del citoesqueleto, permitiendo iniciar la polarización de los gránulos en la célula efectora hacia el polo de unión con la célula diana (Kresnsky A et al, 2005; Takamori Y et al, 2005).

La citotoxicidad ejercida por la granulinsina es favorecida por el sinergismo con otras proteínas citotóxicas como la perforina, que facilita su ingreso al citosol ayudando el proceso de citólisis. Sin embargo se describe una actividad proapoptótica independiente de perforina, secundario a la capacidad de interacción directa con los lípidos de membrana, esto favorece la activación de enzimas con capacidad degradativa de lípidos como la esfingomielinasa – glucosilceramidasa que se encuentran en la membrana plasmática. Esta actividad catalítica

que favorece el aumento de la ceramida que es conocido como un mediador en la apoptosis (Anderson D et al, 2003; Nagasawa M et al, 2014).

La granulisinina de 9 kDa tiene una actividad antimicrobiana de amplio espectro, también se ha descrito como una molécula antitumoral debido a sus características como molécula inductora de apoptosis y como marcador indirecto de la actividad del sistema inmunológico. Esta molécula se caracteriza por tener mayor grado de citotoxicidad que la 15 kDa, esta característica hace que su localización sea exclusiva en los gránulos citotóxicos, lo que dificulta su medición a nivel periférico (Takamori Y et al, 2005). A diferencia, el péptido de 15 kDa es detectable en niveles basales en suero y su elevación podría significar una activación del sistema inmune ya se podría considerar que la relación de estos dos péptidos es 1:1 (Chung W et al, 2008), debido a que el producto de 9 kDa deriva de su clivaje, lo anterior permite proyectar a esta proteína como un biomarcador (Fujita Y et al, 2011; Chung W et al, 2010).

En la literatura se ha citado a la granulisinina como una de las moléculas claves y específicas en la muerte de los queratinocitos en SJS/SJS-NET/NET, dado el estudio realizado por Chung et al en el 2008, donde se evaluó el líquido de las lesiones cutáneas “Flictenas” de pacientes afectados a las 72 horas, encontrado que el mayor número de células pertenecían a CTLs CD 8+ , células NK y NKT activados y la mayor proteína expresada era la granulisinina en relación con la perforina, granzima B y Fas-FasL; sin embargo la lesión cutánea se presenta por el sinergismo de las proteínas citotóxicas previamente descritas (Nagasawa M et al, 2014; Chung W et al, 2008).

Actualmente dada su facilidad de medición sérica, esta biomolécula se ha postulado como indicador del estado biológico de la progresión de la respuesta inmunológica patológica y

para la identificación de pacientes con riesgo de hipersensibilidad a fármacos de uso rutinario (Fujita Y et al, 2011).

Por lo anteriormente expuesto, queda claro que la manifestación de estos fenotipos de RAM cutáneas severas es la interacción de diferentes mecanismos celulares y moleculares expresados en un cuadro clínico de rápida progresión. Por ende cualquier variación como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes que codifican las proteínas del sistema inmunológico innato, podría estar relacionados con la conformación proteica y expresión de la misma que podrían modificar el fenotipo que cambia los patrones de susceptibilidad de forma interindividual o poblacional (Chung W et al, 2010; Domínguez M et al, 2014).

7. Pregunta de Investigación

¿Son las variantes de secuencia del promotor y la región codificante del gen *GNLY* una causa de susceptibilidad a desarrollar el fenotipo de reacción adversa cutánea tipo SJS/NET?

8. Hipótesis

La granulicina se ha encontrado diferencialmente expresada en los pacientes con SJS/NET, lo que hace plausible suponer que las variaciones de secuencia en la región promotora y/o codificante del gen *GNLY* están asociadas con la susceptibilidad genética a desarrollar dichos fenotipos cutáneos, mediante mecanismos moleculares subyacentes a la modificación de los sitios de unión con factores de transcripción o por modificaciones proteicas derivadas de mutaciones no sinónimas.

9. Materiales y Métodos

9.1 Pacientes y controles de estudio

Los pacientes analizados en el presente estudio corresponden a una muestra de 19 pacientes afectados con SJS, SJS/NET o NET. Individuos previamente incorporados en el proyecto de “Asociación de *HLA B*1502* con SJS Y NET en población Colombiana”, desarrollado en el Centro de Investigación de genética y genómica de la Universidad del Rosario (CIGGUR). Cada participante firmó un consentimiento informado autorizando su inclusión en temas de investigación.

Los pacientes incluidos fueron diagnosticados por los médicos tratantes siguiendo los siguientes criterios clínicos:

- Presentar fiebre y malestar post- exposición a medicamentos.
- Presencia de máculas eritematosas que progresan a vesículas/ampollas.
- Evidencia de Necrólisis Epidérmica.
- Compromiso de mucosas.
- Para la definición de SJS: el desfacelamiento epidérmico menor al 10 % de SCT, que incluye la superficie erosionada y la piel con el signo de Nikolsky positivo.
- En los casos de NET el parámetro descrito anteriormente corresponde a más del 30 % de SCT y en los casos con superposición es de 10 % a 30 % SCT.

Siguiendo los criterios diagnósticos se identificó en la población de análisis 5 pacientes con fenotipo SJS, 2 SJS/NET y 12 pacientes NET (Tabla 6).

Para verificar la frecuencia poblacional de las variantes de secuencias identificadas en la región promotora y codificante del gen *GNLY*, se incluyeron 82 controles para la región codificante divididos en dos grupos; el grupo A con 49 individuos procedentes de la ciudad de Valledupar y el grupo B de 33 pacientes en tratamiento con fenitoína, grupos

caracterizados por no tener sospecha clínica de SJS/NET. Para la región promotora se evaluaron 76 individuos, del grupo A 15 controles, del grupo B 21 controles y un tercer grupo denominado C de población abierta que incluyó 40 individuos. Estos controles se realizaron, dado el hallazgo que se evidenció en uno de los casos analizados (ver detalles más adelante).

Cada uno de los participantes firmó un consentimiento informado para su inclusión al estudio, el cual fue previamente aprobado por el comité de ética de la Universidad del Rosario (ver anexo 1).

9.2 Amplificación y secuenciación de la región codificante del gen *GNLY*

Las muestras de los individuos (casos y controles) correspondieron a muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA (10 ml). El ADN fue previamente extraído mediante la técnica de *PROBE* (ver anexo 2). Todas las muestras de ADN fueron cuantificadas mediante espectrofotometría usando nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

Las regiones codificantes del gen *GNLY* (5 exones) fueron amplificadas mediante PCR en la totalidad de los casos, en la tabla 4 se describe la secuencia de primers utilizados para su amplificación. Estos primers fueron diseñados usando el software primer 3. La PCR fue estandarizada y realizada según las condiciones descritas en la tabla 5. La detección de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 4. Primers de Amplificación del gen *GNLY*

| Secuencias de Primers | | | |
|-----------------------|------------------------------|----------------------------|---|
| Gen/ Exón | Forward | Revers | Secuenciación Seq |
| HuGNLYex1 | 5'ttcccttgtaatccgttgg 3' | 5'tgaacctggagcttgactctg 3' | 5'ccttgcataaacatgattccc 3' |
| HuGNLYex2 | 5'ttctctcagagcggaggac 3' | 5'tgacgatctggtttgtgaa 3' | 5'ccagctcgcagggtccc 3' |
| HuGNLYex3 | 5'ttaccctccccgttcagtc 3' | 5'aatctgtgagccccgtgtgc 3' | 5'ctgggggtgtggaggctgttc 3' |
| HuGNLYex4 | 5'ccgtgtaagaggtgtgttc 3' | 5'gtctccatctccttgctgt 3' | 5'cggtcggaacctgacctc 3' |
| HuGNLYex5 | 5'tgaacggttacgaccctaaa 3' | 5'ataccagaaagccaaggcaca 3' | 5'cctcgaacaccgaaaagataag 3' |
| HuGNLYprom1 | 5'gacccatcagactgtgacgtaac 3' | 5'tgaacctggagcttgactctg 3' | 5'tccagaaaagactccctcct 3' 5'gtcggtttagtgggtgacgtg 3' 5'ttcccttgtaatccgttgg 3' |
| HuGNLYprom2 | 5'aattcaccgggacgtgactttt 3' | 5'aggaaggagcttttctgg 3' | 5'aattcaccgggacgtgactttt 3' 5'tccagaaaagactccctcct 3' 5'gtttacgttaggagttgagttg 3' |

Los productos de PCR fueron purificados mediante fosfatasa alcalina y exonucleasa I antes de la secuenciación. Las reacciones de secuencia fueron realizadas con primers internos, diseñados con el software primer 3 (Tabla 4). El análisis de las secuencias de nucleótidos fue realizado a través de alineamientos múltiples usando el programa clustalW, comparando la secuencia de cada paciente con la WT para el gen *GNLY*. Los cromatogramas fueron analizados manualmente con el programa FinchTV.

Tablas 5. Condiciones de PCR para cada exón

| Programa Termociclador | | Tiempo | HuGNLYex1 Amplicón | HuGNLYex2 Amplicón | HuGNLYex3 Amplicón | HuGNLYex4 Amplicón | HuGNLYex5 Amplicón |
|----------------------------------|-----------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Desnaturalización Inicial | 95°C | 10 minutos | 601 pb | 484 pb | 512 pb | 686 pb | 670 pb |
| Numero de ciclos | 35 ciclos | | | | | | |
| Desnaturalización | 95°C | 40 segundos | | | | | |
| Anillamiento | 64°C | 40 segundos | | | | | |
| Elongación | 72°C | 40 segundos | | | | | |
| Elongación Final | 72°C | 10 minutos | | | | | |
| Conservación | 4°C | | | | | | |

9.3 Amplificación y secuenciación de la región promotora del gen GNLY

Las muestras de pacientes y controles analizados corresponden a los descritos en la sección anterior. Las muestras de ADN fueron las utilizadas para la amplificación y secuenciación de la región codificante, según la descripción detallada anteriormente.

Las muestras fueron amplificadas usando primers específicos para analizar hasta -2000 pb de la región promotora. Dichos primers fueron diseñados por el software primer 3 (Tabla 4). Se realizaron dos amplificaciones para todo el fragmento correspondiente al promotor de *GNLY*. Se realizó en volumen final de 25 μ l: 100 ng de ADN, 12.5 μ l Master mix (Promega), 0.8 μ M de cada primer. Las condiciones de PCR para el bloque 1 fueron: desnaturalización inicial: 95°C x 10 min; 35 ciclos de: desnaturalización parcial 95°C x 40 segundos;

alineamiento 67°C x 40 segundos; extensión 72°C x 1 minuto 10 segundos; elongación de 72°C x 10 minutos. El bloque 2 desnaturalización inicial: 95°C x 10 min; 35 ciclos de: desnaturalización parcial 95°C x 40 segundos; alineamiento 65°C x 40 segundos; extensión 72°C x 1 minuto 10 segundos; elongación de 72°C x 10 minutos.

La detección del producto amplificado se realizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron purificados mediante fosfatasa alcalina y exonucleasa I antes de la secuenciación. Las reacciones de secuencia fueron realizadas con primers internos, diseñados con el software primer 3 (Tabla 4). El análisis de las secuencias de nucleótidos fue realizado a través de alineamientos múltiples usando el programa clustalW, comparando la secuencia de cada paciente con la WT para la región promotora del gen *GPLY*. Los cromatogramas fueron analizados manualmente por medio del programa FinchTV.

Las variantes halladas en los casos fueron identificadas en dbSNP para corroborar si habían sido previamente descritas. Se realizó la determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de secuencia halladas en casos y controles mediante conteo directo.

En el caso de los controles, la amplificación mediante PCR fue realizada de manera específica para las variantes de secuencia del promotor que fueron de interés para esta investigación y que fueron identificadas en dos pacientes afectados con el fenotipo SJS, SJS/NET y NET (ver detalles más adelante, en la sección de resultados). Para este fin se usaron las mismas condiciones de PCR, secuenciación y análisis.

9.4 Identificación de sitios de fijación de factores de transcripción en la región promotora del gen *GPLY*

Con el fin de determinar la presencia de sitios de fijación de factores de transcripción en la región promotora del gen *GPLY* en la que se identificaron variantes de secuencia en los casos, se realizó un análisis bioinformático con el programa *Genomatix*. Se utilizó la herramienta *GEMs Launcher* de *Genomatix*, que proporciona un listado de estos sitios de unión que están presentes en comparaciones de secuencias múltiples. La búsqueda se efectúa con *MatInspector*, una herramienta de *Genomatix*, que utiliza una amplia biblioteca de matrices para los sitios de unión a factores de transcripción (*Quandt K et al, 1995*). Además, proporciona los datos de similitud de la secuencia que se está evaluando con la matriz, para el sitio de unión al factor de transcripción al igual que la similitud únicamente con el núcleo o core de ese mismo sitio. Asignado un índice de calidad a los aciertos, permitiendo su filtrado y selección en función de las similitudes de la matriz con la secuencia evaluada (*Quandt K et al, 1995*).

La matriz de librerías de *MatInspector* representa actualmente la mejor herramienta en términos de sensibilidad y especificidad en la predicción de sitios de unión de factores de transcripción e identifica secuencias de unión de ADN de activadores y de represores. Un apareamiento perfecto de la secuencia de ADN con la matriz de la librería otorga un puntaje de 1 mientras que apareamientos catalogados como buenos logran scores de >0.80 (*Takahashi S et al, 2005*).

Como se mencionó anteriormente, los sitios potenciales de unión para factores de transcripción en la región 5'UTR del gen *GPLY* fueron determinados usando el software *Genomatix*. Se realizó la predicción de estos sitios en una región de -2000 pb *upstream* del

codon de inicio ATG. De manera precisa, el análisis se centró en las regiones genómicas con presencia de variantes de secuencia identificadas en los casos. El intervalo genómico fue de -2001 pb a -1 pb, usando como CST (umbral de similaridad) un valor de 0.75.

10. Resultados

10.1 Características Clínicas y Demográficas de los pacientes

La población evaluada en el estudio incluyó a 19 pacientes afectados con el fenotipo SJS, SJS/NET o NET (Tabla 6). El diagnóstico clínico fue establecido por los médicos tratantes de las instituciones participantes, que correspondieron al Hospital Simón Bolívar (Unidad de Quemados) y la Fundación Valle de Lili (Cali). Del grupo total incorporado al proyecto doce pacientes tenían diagnóstico de NET (63.1 %), cinco de SJS (23.6 %) y dos presentaron un fenotipo sobrelapado SJS/NET (10.5 %). De los pacientes evaluados en este estudio el 63.1% requirieron soporte hospitalario, el 26.3 % recibió manejo ambulatorio y el 10.5 % de los pacientes habían presentado más de un evento adverso a fármacos.

El compromiso mucocutáneo fue el signo clínico más relevante en los diferentes fenotipos cuya presentación se observó en el 100 % de los pacientes analizados. El compromiso sistémico se informó en el 78.9 % de los pacientes y en el 21,1 % no se describió el dato.

Con excepción de los pacientes SJS18 y SJS19, los afectados no eran relacionados.

Tabla 6. Características Clínicas y Demográficas

| ID | Edad | Género | Natural | Medicamento Administrado | Síntomas | | | %SCT | Fenotipo |
|-------|------|--------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|------|----------|
| | | | | | Sistémicos | Compromiso de mucosas | Exantema/Fl ictenas | | |
| SJS1 | 29 | F | Aldana/Nariño | Acetaminofén + Codeína | No referido | Oral | Si/No | 10 | SJS |
| SJS2 | 59 | M | Bogotá D.C | Urtica diódica | Fiebre | Oral, Ocular | Si/No | 20 | SJS/NET |
| SJS3 | 59 | F | Valledupar (Cesar) | Colirio | Fiebre | Oral, Ocular | Si/Si | 95 | NET |
| SJS4 | 46 | F | Cali (Valle del cauca) | Lamotrigina | Fiebre, Leucocitosis | Oral, Genital | Si/Si | 70 | NET |
| SJS5 | 48 | F | Bogotá D.C | Medio de Contraste | No referido | Oral, Genital | Si/No | 10 | SJS |
| SJS6 | 68 | F | Ibagué (Tolima) | Carbamazepina | Fiebre | Oral, Ocular Genital | Si/Si | 80 | NET |
| SJS7 | 15 | F | Bogotá D.C | Lamotrigina | Fiebre, Leucocitosis | Oral, Ocular Genital | Si/Si | 80 | NET |
| SJS8 | 37 | M | Bogotá D.C | Cefalexina | Fiebre, Leucocitosis CR-CH | Oral, Ocular Genital | Si/Si | 90 | NET |
| SJS9 | 30 | M | Bogotá D.C | Sulfonamida | No referido | Oral | Si/No | 10 | SJS |
| SJS10 | 35 | M | Villeta (Cundinamarca) | Medio de Contraste | Artralgias | Oral | Si/Si | 10 | SJS |
| SJS11 | 45 | F | Dorada (Caldas) | Fenitoína | Fiebre, Leucocitosis | Oral, Ocular | Si/Si | 60 | NET |
| SJS12 | 36 | F | Puerto Lleras (Meta) | Nitrofurazona | Leucocitosis | Ocular | Si/No | 20 | SJS/NET |
| SJS13 | 5 | M | Girardot (Cundinamarca) | Carbamazepina | Fiebre, Leucocitosis | Oral, Ocular | Si/Si | 80 | NET |
| SJS14 | 18 | M | Bogotá D.C | Carbamazepina | Fiebre, Leucocitosis CH | Oral, Ocular Genital | Si/Si | 80 | NET |
| SJS15 | 54 | F | Cali (Valle del cauca) | Trimetoprin-Sulfametoxazole | Artralgias Leucocitosis | Oral | Si/Si | 78 | NET |
| SJS16 | 9 | M | Cáqueza (Cundinamarca) | Metoclopramida | Fiebre | Oral, Genital | Si/No | 80 | NET |
| SJS17 | 5 | M | Bogotá D.C | Lamotrigina | Fiebre, Leucocitosis CH | Oral, Ocular Genital | Si/Si | 80 | NET |
| SJS18 | 18 | F | Guamo (Tolima) | Sulfadoxina-Pirimetamina | Fiebre, Artralgias | Oral, Ocular | Si/Si | 80 | NET |
| SJS19 | 1 | M | Bogotá D.C | Sulfadoxina-Pirimetamina | No referido | Ocular | Si/No | 10 | SJS |

*CH: Compromiso Hepático, CR: Compromiso Renal

La edad promedio de los pacientes fue de 32 años, con un rango de 1 a 68 años. Evaluando 10 mujeres y 9 hombres. Demográficamente el mayor número de pacientes eran naturales del departamento de Cundinamarca que representa el 57.9 % de los casos, seguido por el departamento del Valle del Cauca y Tolima que representan el 10.5 % y finalmente Caldas, Meta, Cesar y Nariño con 5.2 % de los casos.

Los fármacos asociados a los fenotipos evaluados fueron en su mayoría anticonvulsivantes y antibióticos (36.8 % y 31.5 % respectivamente). También se notificó la reacción adversa

cutánea secundaria al uso de medios de contraste y antipalúdicos en el 10.5 % de los pacientes, mientras que los antieméticos, los medicamentos homeopáticos y los antipiréticos/analgésicos representaron de manera individual el 5.2 % de los casos. El 5.2 % de los pacientes restantes desarrollaron el fenotipo por el uso de un fármaco ocular tipo colirio de principio activo desconocido.

10.2 Secuenciación directa mediante Sanger de la región codificante del gen *GNLY*

La secuenciación de la región codificante del gen *GNLY* en los pacientes afectados, reveló la presencia de dos variantes no-sinónimas situadas en el exón 1 y en el exón 4 (Tabla 7 y figuras 22 y 23).

Tabla 7. Resultados de análisis de secuencia región codificante del gen *GNLY*

| Variantes ORF | c. 11G>A | c.356 C>T |
|-----------------------|---------------------------|---|
| dbSNP | rs.10181739 | rs.11127 |
| Proteína | p.Trp4X | p.Thr119Ile |
| Frecuencia alélica | A: 2.77% G: 97.22% | C: 52.77% T: 47.22% |
| Frecuencia genotípica | G/A: 5.55% G/G: 94.44% | C/T: 27.77% C/C: 38.88% T/T: 33.33% |
| POLYPHEN | NA | Benigno |
| SIFT | NA | Tolerada |

Figura 22. Cromatograma Exón 1 c.11 G>A

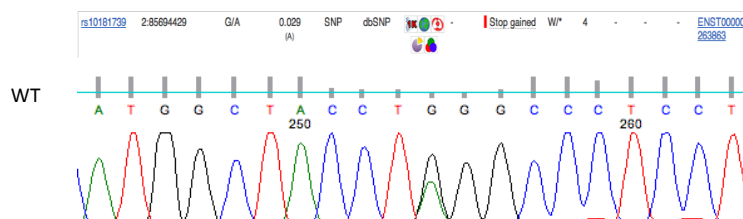
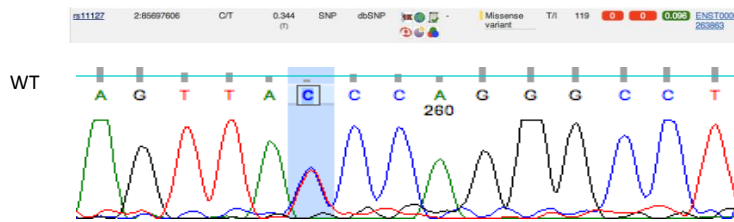


Figura 23. Cromatograma Exón 4 c.356 C>T



Una de las variantes identificadas en los casos corresponde a una mutación no sinónima en estado heterocigoto, que genera un codón de parada prematuro (c.11G>A; p. Trp4X). Los alineamientos de las secuencias proteicas en esta región, indicaron que el triptófano en la posición 4 está conservado de manera estricta en algunas especies de mamíferos (figura 24). Dada la drástica consecuencia de la mutación identificada, se puede sugerir un efecto deletéreo. Además, la conservación de la posición 4 a lo largo de la evolución, puede indicar un rol funcional importante. La paciente en la que se identificó esta mutación correspondía a un fenotipo tipo NET que fue tratado intrahospitalariamente en la unidad de quemados del Hospital Simón Bolívar y que fue desencadenado por una fórmula farmacéutica de tipo colirio oftálmico de principio activo no claro.

Esta paciente inicia con un cuadro clínico de eritema conjuntival y prurito ocular que ocurre posterior a la aplicación de colirio oftálmico. A las 24 horas presenta prurito generalizado con eritema maculopapular y compromiso de mucosa oral, presenta formación de flictenas generalizadas con un compromiso de SCT de un 95 % que requirió manejo en la unidad de quemados.

Figura 24. Alineamiento de secuencias del gen *GNLY* en diferentes especies

```

P22749 GNLY_HUMAN 1 MATWALLLLAAMLLGNPGLVFSRLSP EYYDLARAHLRDEEKSCPCLAQEGPQGDLLTKTQ 60
Q24JZ1 Q24JZ1_BOVIN 1 MTSWAVLLITSVLLVAPGLAFSGLTPESH DQATAHLCDGDELCOGLALEDPQGDLLQGE 60
A6YT17 A6YT17_SHEEP 1 MTSWAVLLIASVLLVAPGLAFSGLAPERH YQATAHLCDGDELCOGLSQEYTOGGLLQGE 60
K7BYN6 K7BYN6_PANTR 1 MATWALLLLAATLLGNPGLVFSRLSP EYYDLARAHLRDEEKSCPCLAQEGPQGDLLTKTQ 60
*:**:**:**:*: ** ***:** *:** : * ***: : : * **: * ***: : :
    
```

Esta mutación ha sido reportada (rs.10181739) con una frecuencia a nivel mundial baja (MAF A: 0.029). Por esta razón decidimos realizar identificación de la variante en las muestras del grupo control descrito en la metodología (Grupo A y B). Los resultados de la genotipificación se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis genético para la mutación c.11G>A en los controles

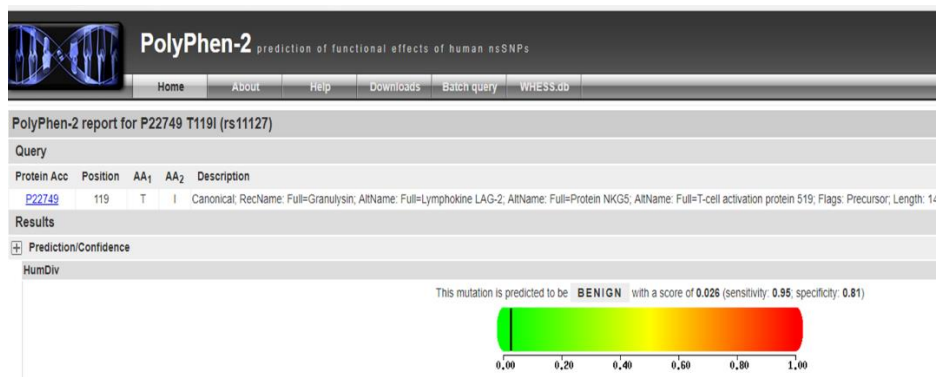
| c. 11G>A | |
|--|--------------------------|
| dbSNP | rs.10181739 |
| Proteína | p.Trp4X |
| Frecuencia alélica grupo control A | A: 1.02% G: 98.9% |
| Frecuencia alélica grupo control B | A: 1.51% G: 98.48% |
| Frecuencia genotípica grupo control A | G/A: 2.04% G/G: 97.9% |
| Frecuencia genotípica grupo control B | G/A: 3.0% G/G: 96.96% |

Los hallazgos sobre la población de controles, indicó que dos de ellos (1 del grupo A y 1 del grupo B) presentaron la variante en el gen *GPLY* c.11G>A en forma heterocigota. De manera interesante, el control procedente de la ciudad de Valledupar (ciudad de origen de la paciente NET con la variante) refiere antecedentes de crisis asmáticas, hipersensibilidad a AINES y adenoidectomía. Este hallazgo nos permite hipotetizar una susceptibilidad de la paciente a fármacos con posibles respuestas de hipersensibilidad tipo I y tipo IV. Por otro lado, la paciente del grupo B con la variante en estado heterocigoto no refiere episodios de esta naturaleza.

En cuanto a la segunda variante de secuencia encontrada en el grupo de pacientes analizados (rs1127; c.356 C>T; p.Thr119Ile), corresponde a un cambio no-sinónimo de tipo missense. Esta variante ha sido previamente reportada con una frecuencia alélica a nivel mundial alta

(MAF T: 34.4%). El análisis *In Silico* mediante Polyphen 2 indicó que esta variante es benigna (Score de 0.026) (Figura 25), por lo que consideramos que es un polimorfismo y no está relacionado con la susceptibilidad al fenotipo de estudio del presente proyecto.

Figura 25. Análisis *In Silico* mediante Polyphen 2 de la variante p.Thr119Ile.



10.3 Secuenciación directa mediante Sanger de la región promotora del gen *GNLY*

La secuenciación de la región promotora del gen *GNLY* en los pacientes afectados reveló la presencia de 7 variantes, que se describen en las Tabla 9. De ellas 5 estaban previamente reportadas en las bases de datos de *Ensembl* con frecuencias alélicas mínimas entre 0.015 a 0.44 (Tabla 9). Este hallazgo y dado la alta frecuencia reportada para estas variantes en la población de afectados del presente proyecto hacen plausible considerar que se tratan de polimorfismos muy probablemente no relacionados a la susceptibilidad de SJS o NET. Por otro lado, las variantes -1253 C>T y -458_447del corresponden a cambios de secuencia que no han sido previamente reportados en las bases de datos. Los análisis de *Genomatix* que permitieron la identificación de factores de transcripción (TBS) que potencialmente se unen a estas regiones específicas del genoma, indicaron que sólo en la posición del promotor donde se identificó la delección es probable la unión con TBS's específicos (ver resultados más adelante). Por esta razón, fue importante determinar en muestras de controles (Grupos A, B

y C) si existía este cambio en la secuencia para poder determinar si el hallazgo de la variante nueva estaba ligado a una característica genética propia de la población colombiana (Tabla 10).

Tabla 9. Variantes de la Región Promotora

| Variante - 1.457 A>G rs. 116184619 | | Variante -1.293 T>G rs. 3755007 | |
|---|---------|---|---------|
| Frecuencia Genotípica - 1457 A>G | | Frecuencia Genotípica -1.293 T>G | |
| A/G | 5.5 % | T/G | 27.77 % |
| A/A | 94.44 % | T/T | 33.33 % |
| G/G | 0.0 % | G/G | 38.88 % |
| Frecuencia Alelica - 1457 A>G | | Frecuencia Alelica -1.293 T>G | |
| A | 2.77 % | T | 47.2 % |
| G | 97.22 % | G | 52.7 % |
| Variante - 1.253 C>T | | Variante - 1.213 T>C | |
| No tiene rs | | rs. 2886767 | |
| Frecuencia Genotípica - 1.253 C>T | | Frecuencia Genotípica - 1.213 T>C | |
| C/T | 0.0 % | T/C | 38.88 % |
| C/C | 88.88 % | T/T | 27.77 % |
| T/T | 11.11 % | C/C | 33.33 % |
| Frecuencia Alelica - 1.253 C>T | | Frecuencia Alelica - 1.213 T>C | |
| C | 94.44 % | T | 52.77 % |
| T | 5.55 % | C | 47.22 % |
| Variante - 458_447del | | Variante - 189 G>T | |
| No tiene rs | | rs. 1866140 | |
| Frecuencia Genotípica - 458_447del | | Frecuencia Genotípica - 189 G>T | |
| WT/del | 11.11 % | G/T | 33.33 % |
| del/del | 0.0 % | G/G | 22.22 % |
| WT/WT | 88.88 % | T/T | 44.44 % |
| Frecuencia Alelica - 454_444del | | Frecuencia Alelica - 189 G>T | |
| WT | 94.44 % | G | 38.88 % |
| del | 5.55 % | T | 61.11 % |
| Variante - 153 G>C | | | |
| rs. 1866139 | | | |
| Frecuencia Genotípica - 153 G>C | | | |
| G/C | 27.77 % | | |
| G/G | 22.22 % | | |
| C/C | 50.0 % | | |
| Frecuencia Alelica - 153 G>C | | | |
| G | 36.11 % | | |
| C | 63.88 % | | |

Tabla 10. Datos poblacionales de la variante del promotor - 458_447del en la población de controles

| <i>GNLY</i> -458_447del | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| No reportado | dbSNP |
| WT: 100% Delección: 0.0% | Frecuencia alélica grupo control A |
| WT: 100% Delección: 0.0% | Frecuencia alélica grupo control B |
| WT: 100% Delección: 0.0% | Frecuencia alélica grupo control C |
| WT/WT: 100% | Frecuencia genotípica grupo control A |
| WT/WT: 100% | Frecuencia genotípica grupo control B |
| WT/WT: 100% | Frecuencia genotípica grupo control C |

Los resultados obtenidos en la población control analizada no indicó la presencia de la delección en la región promotora del gen *GNLY*, lo que permite establecer que esta variante es exclusiva de los afectados de SJS/NET.

10.4 Identificación de sitios potenciales de unión de factores de transcripción a la región promotora del gen *GNLY*

El software Genomatix predijo 552 sitios potenciales de unión de factores de transcripción (TBS's) en la región de 2000 pb analizada en el promotor del gen *GNLY* (-1 a 2000). Para los sitios específicos de la región promotora del gen en la que se evidenciaron variaciones de secuencia en los pacientes SJS/NET el software determinó varios factores que podrían fijarse de manera específica (Tabla 11). De ellos son de particular interés los TBS's encontrados en la región promotora del gen *GNLY* en la que fue hallada la variante -458_447del, ya que como se especificó anteriormente es exclusiva de pacientes y no reportada previamente en las bases de datos. De manera precisa y como se discutirá más adelante es posible que los

factores CCAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP) épsilon y CCAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP) gamma de potencial unión a la región 5'-accattagGCAAcca-3' y 5'-ccattagGCAAaccag-3' respectivamente (sitio canónico que involucra la posición de la variante de tipo deleción), sean buenos candidatos para ser postulados como reguladores de la transactivación de granulisina.

Tabla 11. Variantes de la Región Promotora identificadas por *Genomatix*

| Variante de secuencia Promotor | Factor de Transcripción de Unión Genomatix | Función |
|--------------------------------|---|--|
| -1.457 A>G | SWI/SNF "SWIth/Sucrose Non Fermentable" 5'caACATatgga 3' | Los complejos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP son maquinaria proteínica especializada capaz de reestructurar el nucleosoma para hacer que su ADN sea accesible durante la transcripción, la replicación y la reparación del ADN (<i>Tang L et al, 2010</i>). |
| -1.293 T>G | C2H2 "zinc finger protein PLZF" 5'aggTACAgagcaaga 3' | Es un factor de transcripción altamente expresado en células mieloides indiferenciados. Se sugiere un papel importante en leucemogénesis y desarrollo de células mieloides. También se ha reportado en células del sistema endocrino, sistema urogenital y células germinales (<i>Takahashi S et al, 2002</i>). Se ha asociado con leucemia promielocítica aguda (APL) (<i>Takahashi S et al, 2002</i>). |
| - 1.253 C>T | No se asoció con ningún factor de transcripción | |
| - 1.213 T>C | SOX/SRY "sex/testis determinig and related HMG box factors" 5'gatgagggAATGggaatcgtatagg 3' Yin Yang 2 "Activator/repressor binding to transcription initiation site" 5'cgatteCCATtcctcatcctcc 3' | Desempeñan un papel general en la embriogénesis, esta relacionado con dominios HMG box, involucrados en la interacción proteína-proteína y unión al DNA que le permite regular diversos procesos durante el desarrollo (<i>Kamachi Y et al, 2013</i>). El YY2 es un factor multifuncional que puede actuar como activados o represor de un gran número de genes que participan en el desarrollo de estructuras embrionarias (<i>Deng Z et al, 2010</i>). |
| - 458_447del | Yin Yang 2 "Activator/repressor binding to transcription initiation site" 5'agggaaCCATtagcaaccaggg 3' C/EBP é "CCAAT-enhancer-binding proteins" 5'-accattagGCAAcca-3' | El YY2 es un factor multifuncional que puede actuar como activados o represor de un gran número de genes que participan en el desarrollo de estructuras embrionarias (<i>Deng Z et al, 2010</i>). Las proteínas de unión CCAAT / potenciador (C / EBP) tienen una función importante en la diferenciación granulocítica y también están implicadas en la leucemogénesis (<i>Kaisho T et al, 1999</i>). Se ha descrito C/EBP es un posible elemento regulador de la transcripción, lo que sugiere |

| | | |
|-----------|---|--|
| | <p>C/EBPγ “CCAAT-enhancer-binding proteins”</p> <p>5'-ccattagGCAAaccag-3'</p> | <p>que la expresión del gen puede regularse activamente durante procesos infecciosos o inflamatorios (<i>Kida Y et al, 2001, Kida Y et al, 2002</i>).</p> |
| - 189 G>T | <p>KLF 15 “Kidney-enriched kruppel-like factor”</p> <p>5'tgtgggagtGGGGtgtggc 3'</p> <p>IKAROS “family zinc finger 5 (Pegasus)”</p> <p>5'gagtgGGTGtgg 3'</p> <p>KFL 3 “Basic krueppel-like factor”</p> <p>5'gagtgGGTTgtggcatgga 3'</p> | <p>Es el primer KLF que se encontró involucrado en la adipogénesis. La expresión de KLF15 es también abundante en tejido muscular (corazón, músculo esquelético y aorta), riñón e hígado (<i>Zeni W et al, 2013</i>).</p> <p>Se describe como un regulador central de la diferenciación de linfocitos T y B (<i>John L et al, 2011</i>).</p> <p>KLF3 se expresa altamente en células eritroides, y otros tejidos, sobre todo en la región del mesencéfalo (<i>Zeni W et al, 2013</i>).</p> |
| - 153 G>C | <p>AP4 “Activator protein 4”</p> <p>5'agaagCAGCtcaggcca 3'</p> | <p>Los factores de transcripción de la familia básica de hélice-bucle-hélice-cremallera (bHLH-ZIP) contienen un dominio básico, que se utiliza para la unión al ADN, y dominios HLH y ZIP, que se usan para la oligomerización. El factor de transcripción AP4 activa genes virales y celulares (<i>Jie C, et al 2008</i>).</p> |

11. Discusión

Las toxicodermias son reacciones de hipersensibilidad provocadas por una activación excesiva o inapropiada del sistema inmunológico y corresponde a una respuesta de hipersensibilidad retardada, ya que depende de la participación de células efectoras como los linfocitos T citotóxicos y las células NK. Estas respuestas inmunes no deseadas están involucradas en varios desórdenes dentro de los que se incluye el síndrome de Stevens Johnson (SJS) y la Necrólisis Epidérmica Tóxica (NET). Es claro que el fenotipo en estas entidades se da por una reacción de sensibilidad específica a medicamentos iniciada por los linfocitos citotóxicos (*Krensky et al, 2009*) y que el mecanismo molecular subyacente involucra al complejo mayor de histocompatibilidad. Los hallazgos de asociaciones genéticas entre los alelos de HLA-B y las reacciones no deseadas a medicamentos específicos (*Chung*

W et al, 2012), motivó a realizar los primeros estudios en pacientes Colombianos con SJS/NET. De esta manera, previo al presente proyecto, el grupo de la Universidad del Rosario del Centro de Investigación de Genética y Genómica (CIGGUR) analizó en los pacientes referidos en este trabajo un estudio de identificación de HLA-B*1502 mediante secuenciación de alta resolución. Los hallazgos reportados en dicho estudio, indicaron que a diferencia de otras poblaciones este alelo no está relacionado con la susceptibilidad a desarrollar SJS/NET en la cohorte colombiana evaluada (Comunicación personal).

Sin embargo, considerando la severidad clínica a corto y largo plazo, la alta mortalidad asociada y lo poco que se conoce de la patogénesis del SJS/NET (*Dodiuk-gad et al, 2015*), es de gran interés aportar al conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a la generación del fenotipo. Bajo esta consideración, se plantea la prioridad de buscar posibles marcadores genéticos de la susceptibilidad a SJS/NET. De esta manera abordamos el análisis genómico de la granulicina teniendo en cuenta que: a) es una molécula citotóxica específica del fenotipo, b) Se ha propuesto que los niveles séricos elevados son predictores de reacciones dermatológicas y c) se ha propuesto como una molécula que podría ser potencialmente usada en diagnóstico y tratamiento de desórdenes asociados a respuestas inmunológicas no deseadas (*Chung W et al, 2004; Thong et al, 2013*).

En la población de pacientes afectados analizados en este proyecto (19), el fenotipo más frecuente fue NET (63.1 %), seguido de SJS (26.3 %) y finalmente SJS/NET (10.5 %), si tenemos en cuenta que mundialmente la incidencia anual de NET es más baja que la de SJS (0.4 a 1.2/millón vs 1 a 6/millón) (*Yang M-K et al, 2016*) podemos inferir que nuestro hallazgo es secundario a la estrategia usada para el reclutamiento de pacientes. De manera precisa, cerca del 60 % de los pacientes fueron identificados en la unidad de quemados del

Hospital Simón Bolívar, lo que hace pensar que se trataban de condiciones severas que requirieron manejo hospitalario con mayor soporte clínico y paraclínico. Similar a otros reportes (*Assier et al, 1995; Thong et al, 2013*), en los pacientes analizados el compromiso mucocutáneo fue el signo clínico más relevante 100 % de los afectados analizados lo exhibieron. Este compromiso es severo y se extiende a la formación de lesiones eritematosas que terminan en lesiones bullosas dolorosas y hemorrágicas (flictenas), que comprometen varios tejidos y por ende la calidad de vida de los pacientes. En casos extremos el compromiso de mucosa y estructuras oculares puede conducir a pérdida de agudeza visual en los pacientes afectados (*Meneux et al, 1998; Guedry et al, 2009*).

Semejante a lo que se ha reportado en la literatura mundial, en la cohorte de pacientes analizados se evidenció que la causalidad de SJS/NET fue secundaria a la ingesta de antibióticos y anticonvulsivantes en la mayoría de los pacientes (*Mockenhaupt et al, 2008; Jeung et al, 2010; Frey et al, 2017*). De manera interesante dos de los pacientes analizados presentaron el fenotipo tras la administración de medio de contraste, lo cual ha sido reportado en menor frecuencia que otros principios activos previamente descritos (*Brown et al, 2013; Laffitte et al, 2013*).

Es plausible pensar que en el desarrollo de estas reacciones cutáneas no deseadas, participan diferentes mecanismos de sensibilización de fármacos de diferente naturaleza.

En lo concerniente a los hallazgos de las variantes de secuencia en la región codificante del gen *GPLY*, estimamos que el cambio c.356C>T no está relacionado con la susceptibilidad del fenotipo dada su alta frecuencia en la población general, la cual también se evidencio en el grupo de pacientes analizados. Por su parte la variante c.11G>A encontrada en estado heterocigoto en una de las pacientes analizadas (SJS3), genera una proteína truncada que sólo

conserva 4 de los 145 aminoácidos de la proteína normal. Esta variante ha sido reportada (rs10181739) con una frecuencia muy baja en las bases de datos poblacionales y alcanza los valores más altos en las poblaciones africanas (0.2) (db-SNP database). La paciente que porta el alelo mutante es de la región de Valledupar, ciudad que es el asentamiento de cerca del 65 % de la población total afrocolombiana del Cesar (*PNUD, Colombia 2010*). Por esta razón consideramos el análisis poblacional de la variante en individuos de esta misma región así como de personas tratadas con fenitoína (medicamento asociado a SJS/NET) que no habían desarrollado la RAM cutánea. Los resultados no indicaron una diferencia significativa entre la frecuencia alélica o genotípica en el grupo de pacientes y controles. Desde esta perspectiva poblacional, estos hallazgos están a favor de la pérdida de asociación entre la variante y el fenotipo. Aun así, la consecuencia severa que se puede atribuir a la mutación nonsense nos permite inferir una pérdida en la funcionalidad de la proteína, de esta manera esta mutación puede estar contribuyendo a la susceptibilidad del fenotipo de estudio. Dada la naturaleza poligénica de la respuesta a los medicamentos, en donde se debe considerar las vías farmacocinéticas y farmacodinámicas, podemos considerar que el desarrollo del fenotipo sea el resultado del efecto aditivo de polimorfismos genéticos relacionados con las dos vías. Dado que en el alcance de este trabajo solo se contempló la aproximación genómica del gen *GPLY*, no podemos descartar la presencia de otras variantes en la paciente portadora de la mutación c.11 A>G que expliquen el desarrollo del fenotipo tipo NET. En este contexto, se ha descrito que el polimorfismo de *CYP2C9*3* es un factor genético relevante y asociado al desarrollo de SJS/NET (*Chung W et al, 2014*). Estudios posteriores podrán determinar si la presencia de más de una variante de susceptibilidad en los pacientes que desarrollan el fenotipo explica la presencia de portadores de la variante *GNY*- c.11G>A expuestos a medicamentos de riesgo, como la fenitoína y que son sanos. De manera interesante, uno de

los controles de la ciudad de Valledupar en la que se identificó la variante *GNLY*-c.11G>A refirió hipersensibilidad a AINES, adenoidectomía y asma. *Grigoryev et al 2008*, realizó el análisis transcriptómico de pacientes asmáticos a partir de células mononucleares de sangre periférica e identificó que dentro de los genes diferencialmente desregulados se encontraba el gen *GNLY*, con una sobreexpresión de 1.73 veces en el grupo de mujeres analizadas. Este estudio demostró que *GNLY* es un gen potencialmente asociado al desarrollo de hipersensibilidad tipo I (asma) y apoya las observaciones de otros autores en cuanto al papel de la granulinsina en fenotipos relacionados con respuestas inmunológicas (*Krensky et al, 2009; Nagasawa et al, 2014*). En consecuencia, las variantes de este gen pueden ser la causa o generar la susceptibilidad de estas entidades y podría responder a las manifestaciones referidas por la muestra control de nuestro estudio que presenta el cambio *GNLY*-c.11G>A. Consideramos necesario realizar validaciones funcionales *In vitro* que exploren estas hipótesis.

Al respecto cabe mencionar que investigadores del CIGGUR han identificado mediante diferentes análisis (localización subcelular por GFP, Western Blot, Inmunofluorescencia indirecta) que el alelo *GNLY*-c.11G>A descrito en el presente proyecto traduce a una proteína de localización diferente a la producida por el alelo *wild Type* (WT), y pretende inferir que mecanismo molecular explica este hallazgo (ej. reiniciación de traducción, *readthrough*, uso de sitio no canónico de inicio de traducción u otro). A pesar que este resultado no está en el alcance del presente proyecto, las conclusiones del mismo apoyará desde la perspectiva de la validación funcional la hipótesis que considera la susceptibilidad al desarrollo de SJS/NET en los pacientes portadores de dicha variante.

En lo concerniente al análisis del promotor del grupo de pacientes analizados, nuestros hallazgos identificaron 7 variantes. De ellas, 6 correspondieron a cambios puntuales y una correspondió a una delección de 11pb “ccattagcaa”. Estimamos que las variantes -1.293 T>G, - 1.213 T>C, - 189 G>T y - 153 G>C no están relacionadas en la patogénesis de SJS/NET debido a que se presentan en alta frecuencia en la población general y por lo tanto se tratan de polimorfismos. Desde esta perspectiva, los cambios -1.457 A>G, -458_447del y - 1.253 C>T son de mayor interés para nuestros análisis ya que se presentan con frecuencias alélicas muy bajas o no están descritas previamente en las bases de datos. Con el objetivo de inferir una implicación biológica de estas variantes realizamos el análisis de búsqueda de potenciales factores de transcripción (FT) que se fijaran de manera específica en las regiones del promotor en donde se localizaron dichos cambios. Dando relevancia a las variantes de interés, identificamos que en la posición -1253 C>T que es un cambio no reportado y de alta frecuencia en nuestra población de afectados no se encontró por la herramienta bioinformática ningún potencial FT. Por su parte en la región -1457 A>G se encontró el FT SWI/SNF. Para estos factores no hay reportes que indiquen expresión específica en las células NK o CTL's (relacionadas con la expresión de granulisina), lo que no nos permite inferir acerca de la regulación del promotor del gen *GPLY* en el contexto del desarrollo de SJS/NET.

Respecto a la variante - 458_447del hallada en dos pacientes afectados no relacionados, es interesante resaltar la potencial unión con los factores de transcripción CAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP) épsilon y CCAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP) gamma. A pesar que la regulación de la expresión de la granulisina no está dilucidada, se ha identificado sitios de unión sobre el promotor del gen *GPLY* para los factores *activator protein-1* (AP-1),

CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) y *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) (Yamanaka et al, 1997; Kida et al, 2001; Kida et al, 2002; Nagasawa et al, 2014). Usando el sistema de gen reportero en una línea celular de monocitos (THP-1) estimulada con *Acholeplasma laidlawii* (*A. laidlawii*) Kida et al 2002, reportó que dos sitios de unión AP-1 y uno de C/EBP β son importantes para la regulación de la transcripción mediante mecanismos activadores y represores respectivamente (Kida et al, 2002). Los factores de transcripción hallados por Genomatix en nuestro estudio pertenecen a la misma familia descrita y validada por Kida et al 2002, por lo que podemos inferir una potencial acción en la regulación del gen *GNLY*. El hecho que en la localización de la delección hallada en los pacientes está el sitio potencial de unión a dichos factores sugerimos una implicación funcional. Basados en la acción represora de C/EBP β , el posible efecto de la variante de delección estaría a favor de una sobreexpresión, lo cual es concordante con lo descrito en estudios de transcriptómica de pacientes SJS/NET, en las que se ha reportado una expresión diferencial de granulicina 20 veces mayor respecto a los controles (Chung W et al, 2008). Es necesario realizar los test *In Vitro* mediante análisis de genes reporteros de luciferasa para explorar estas hipótesis y así realizar la validación funcional de los hallazgos.

12. Conclusiones

1. El presente trabajo realizó por primera vez en pacientes colombianos afectados de SJS/NET, una aproximación genómica de *GNLY* a través del análisis de la región codificante y promotora del gen.
2. La evaluación de la región codificante en los pacientes analizados identificó una variante nonsense en estado heterocigoto (c. 11G>A, p. Trp4X) que genera un codón de parada prematuro. La drástica consecuencia del cambio de la variante podría

sugerir un efecto en la susceptibilidad de SJS/NET, lo cual debe ser validado mediante estudios funcionales. El hallazgo de esta variante de secuencia en dos controles no necesariamente descarta su asociación con el fenotipo de estudio, dada la naturaleza poligénica de las reacciones adversas cutáneas severas.


3. El análisis de la región promotora de *GNLY* identificó variantes de secuencia polimórficas y ya reportadas en bases de datos (-1.293 T>G, - 1.213 T>C, - 189 G>T y - 153 G>C) sobre las cuales estimamos la pérdida de una asociación con el desarrollo de SJS/NET.
4. En la región promotora de *GNLY* se identificaron en pacientes SJS/NET 2 cambios de secuencia propios de la población de estudio y que corresponden a -458_447del y - 1.253 C>T. El análisis de sitios potenciales de unión para factores de transcripción realizado mediante genomatrix no identificó ningún factor de unión sobre la posición -1253, por lo que no podemos inferir una función reguladora en este sitio.
5. El análisis de genomatrix identificó que los factores de transcripción CAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP) épsilon y CCAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP) gamma pueden potencialmente fijarse en el sitio del promotor de *GNLY* sobre el cual fue identificada una delección de 11 pb (a -458_447del). Esta variante no se ha reportado en las bases de datos y tampoco se identificó en los controles colombianos analizados. Se estima que en los pacientes portadores de la delección puede darse una modificación en la transactivación de *GNLY*, lo cual debe ser validado funcionalmente.

13. Perspectivas

1. Con los resultados derivados de este trabajo consideramos necesaria la realización de estudios funcionales (western blot, IFI, localización celular, análisis de apoptosis, entre otras) sobre la variante de la región codificante c.11G>A, para dilucidar su potencial efecto patogénico.
2. De la misma manera estimamos importante realizar los estudios de validación funcional mediante análisis del gen reportero de Luciferasa para describir el efecto sobre la transactivación del gen *GNLY* relacionados con las modificaciones de unión a factores de transcripción específicos.
3. Consideramos aumentar el número de pacientes afectados con el fenotipo SJS, SJS/NET y NET para realizar análisis ampliados del gen *GNLY*.

14. Anexos

14.1 Anexo 1 Aprobación comité de ética de la Universidad del Rosario


ANEXO I

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS
BIOLÓGICAS CON EL OBJETO DE REALIZAR UN TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN**

**Aproximación genómica y transcriptómica de pacientes afectados por
reacciones adversas medicamentosas cutáneas severas: Hacia la
descripción de marcadores moleculares predictivos**

Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario - con la participación de:

Dr. PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD: Médico e investigador principal, genetista molecular, Director Científico Unidad de Genética, Universidad del Rosario.

DORA FONSECA MSc: Bióloga y coinvestigadora

JUAN JAIME ATUESTA NEGRET MD, Médico dermatólogo y coinvestigador, Coordinador de Convenios Docencia-Servicio Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Bogotá.

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- (a) La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- (b) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- (c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.
- (d) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada individuo permanecerán

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO

Determinar por técnicas de secuenciación a gran escala si existe, en pacientes con Síndrome de Stevens-Johnson-SJS/TEN (vs controles), una sobre-representación de variantes no-sinónimas en genes candidato que sugieran una asociación causal. Este estudio se realizará a partir de la muestra de una muestra de sangre periférica. Además, a partir de una aproximación transcriptómica de las lesiones cutáneas en pacientes SJS/TEN (vs controles) se buscará determinar si existe una susceptibilidad basal del tejido de presentar la enfermedad. Este estudio constituye el primer tamizaje a nivel genómico y transcriptómico global del SJS/TEN medicamentoso que permita una mejor comprensión de los mecanismos etopatológicos de la enfermedad.

JUSTIFICACION

El Síndrome de Stevens-Johnson puede considerarse como una enfermedad grave por su alta mortalidad. En la actualidad, no existen marcadores moleculares predictivos de la enfermedad. Este estudio aportará información relevante para la comprensión de mecanismos genéticos que predisponen a su aparición.

PROCEDIMIENTO:

Se realizará una entrevista con usted y se tomará una muestra, con una jeringa desechable, de aproximadamente 6 ml de sangre a partir de una vena del antebrazo. Durante la misma consulta un dermatólogo tomará una biopsia de piel del otro antebrazo previa administración de anestesia local (xilocaína). En el caso de que se haya reportado durante la anamnesis antecedentes de alergias a este anestésico se le administrará uno diferente según los protocolos manejados en estos casos. En el caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar la(s) muestra(s) nuevamente. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en el laboratorio de biología molecular y celular de la Universidad del Rosario. Esta muestra será rotulada con un código que garantice la confidencialidad de su origen y no será trasladada a terceros.

Luego de haber tomado la muestra de sangre y de tejido de cutáneo como se describe anteriormente se procederá, en el laboratorio de Biología de Molecular de la Universidad del Rosario, a procesar las muestras. Este procedimiento consiste en obtener ADN y ARN que se utilizará para analizar todas las regiones codificantes de sus genes y la expresión global en la piel (es decir el "exoma" y el "transcriptoma").

participe como un control, se le entregará el resultado del exoma, el cual no mostrará ninguna relación entre con la causa de alguna enfermedad.

AUTORIZACION

La utilización de la muestra podría ayudar en el futuro a entender mejor las causas y/o el comportamiento de la(s) enfermedad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y/o su familia no se beneficien directamente de estos estudios. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que las muestras que me fueron extraídas sean DESECHADAS una vez completado el estudio.

Autorizo conservar las muestras que me fueron extraídas con la posibilidad de emplearlas junto con el resultado del estudio, en las situaciones señaladas a continuación:

- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, enviando la muestra al exterior a el(los) laboratorio(s) de el(los) instituto(s) antes mencionado(s). SI No
- En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia. SI No
- En estudios de investigación específicos para alguna de las enfermedades citadas anteriormente siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación. SI No
- En estudios de investigación internos a la Institución o que impliquen otros centros nacionales/internacionales, siempre y cuando exista un acuerdo interinstitucional aprobado por el comité de ética, que garantice el anonimato de mis datos de identificación. SI No

Declaración de Consentimiento informado

Leí (o me fue leído) y he entendido la información sobre el estudio "Aproximación genómica y transcriptómica de pacientes afectados por reacciones adversas medicamentosas cutáneas severas: Hacia la descripción de marcadores moleculares predictivos" y tuve la oportunidad de hacer preguntas y de recibir respuestas satisfactorias para todas ellas.

RIESGOS E INCOMODIDADES

La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por las tomas de muestras referidas en el procedimiento. Algunas molestias pueden ser: enrojecimiento (hematomas) y/o sensibilidad al tacto en el lugar de donde se extraen las muestras. Sin embargo, estas serán de manera transitoria. El posterior análisis de la muestra no implica riesgo para su salud ni efectos contaminantes para el medio ambiente. La utilización del ADN genómico y el ARN humano no implica a la fecha de hoy ningún riesgo para el donante y/o quienes lo manipulan.

BENEFICIOS:

Este estudio permitirá en algunos casos explicar el origen genético de la reacción alérgica a medicamentos que usted ha sufrido. En este caso, miembros de su familia podrían beneficiarse del mismo examen con el objetivo de recomendar, si son portadores de variantes causales, la no-utilización del fármaco que indujo la enfermedad en su caso. En el caso que usted no haya sufrido de esta enfermedad, es decir que participe como un control, podrá tener acceso al resultado del exoma que puede tener beneficios en el futuro cuando se descubran predisposiciones a otras enfermedades. Sin embargo en la actualidad dicho beneficio no es aplicable y su muestra no será utilizada para tal fin.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

El análisis genómico a partir de muestras de ADN y ARN humanas no implica riesgos para el paciente.

MANEJO DE RESULTADOS

Los resultados del estudio se informaran a los participantes de manera oral y escrita. Se efectuara para tal fin una consulta con los especialistas clínicos y los responsables del análisis molecular. Se informará entonces sobre la implicación de factores genéticos en la aparición del síndrome de Stevens-Johnson: A) Las variantes de los genes analizados y/o su expresión en la piel no están implicados en la causa de su enfermedad. B) Las variantes de los genes analizados y/o su expresión en la piel tienen una probabilidad baja de estar asociados al origen de su enfermedad C) Las variantes de los genes analizados y/o su expresión en la piel tienen una alta probabilidad de estar asociados a la causa de su enfermedad. En el caso que usted no haya sufrido de esta enfermedad, es decir que

Mi participación es voluntaria en este estudio es totalmente voluntaria y puedo abandonarlo en cualquier momento y por cualquier razón, sin que esta decisión afecte mi atención médica futura en esta institución, y se me ha dicho que mi decisión no afectará mi atención médica futura, por tanto

DOY MI CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA SER PARTE DE ESTE ESTUDIO CLINICO.

Identificación

Nombre

Firma del Paciente

Identificación

Nombre

Dirección

Teléfono

Identificación

Nombre

Dirección

Telefono

Firma Testigo I

Firma Testigo II

Bogotá, D.C.,

mes de

del año

En caso de cualquier inquietud, sugerencia o deseo de salir del estudio, usted se puede comunicar directamente con:

PAUL LAISSUE, M.D.PhD. Cra 24N° 63C69. 3474570/ext 266

Dr Álvaro Vélez, Presidente del Comité de Ética en Investigación, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Tel: 3474570 extensiones 380-249.

14.2 Anexo 2 Extracción de DNA Genómico (PROBE)

Para la extracción de DNA se utiliza el método PROBE + proteinasa K, método operativo estandarizado en el laboratorio.

Se toman 6 ml de solución Buffer de glóbulos rojos en un tubo falcón de 15 ml y adicionar sangre periférica hasta completar con pipeta Pasteur y mezclar hasta lograr la homogenización. Luego se agita fuertemente en una plataforma (shaker) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante por inversión y se conserva el pellet.

Se realiza segundo lavado con 3 ml de la solución de lisis de glóbulos rojos y se mezcla vigorosamente el pellet en vortex y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante por inversión. Se adiciona 4 ml de buffer de lisis celular y se realiza vortex por 5 minutos, hasta la completa homogenización. Se adiciona 10 µl de solución de proteinasa K a la muestra y mezclar con el vortex. Posteriormente se incuba por 4 horas a 56°C en baño maría.

Se adiciona 800 µl de solución precipitante de proteínas, mezclar atreves de vortex dejar a 4°C por 5 minutos y centrifugar a 4500 rpm durante 20min a 4°C.

Transferir por inversión el sobrenadante a un tubo falcón de 15 ml que contenga 3 ml de isopropanolol frio a (99%) y mezclar cuidadosamente por inversión hasta visualizar la mota de ADN, se pesca con pipeta o punta de micropipeta y se transfiere a tubo eppendorf. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Dejar secara temperatura ambiente por una hora

para eliminar trazas de alcoholes. Agregar 200 μ l de Buffer TE 1X al pellet de ADN obtenido.
Incubar DNA en nevera a 4°C durante la noche, cuantificar y almacenar a -20°C.

14.3 Anexo Analisis de Genomatix

| A | E | F | O | T | U | V |
|-----------|-----------------|---|-----------|---------------------------|-------------------------|--------|
| Seq. name | matrix | Family Information | Core sim. | Sequence | reverse complement | de los |
| 1 | TempSeq_V\$RU49 | Zinc finger transcription factor RU49, zinc finger proliferation 1 - Zi | 1 | aAGTAcc | | |
| 3 | TempSeq_V\$HAML | Human acute myelogenous leukemia factors | 1 | ccctGTGGtacttcg | | |
| 4 | TempSeq_V\$AP2F | Activator protein 2 | 1 | gtccCCTGtggtact | | |
| 5 | TempSeq_V\$NOLF | Neuron-specific olfactory factor | 1 | ctctgtTCCcctgtgtacttcg | | |
| 6 | TempSeq_V\$GCMF | Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding do | 1 | cggtCCCCtgtgtgt | | |
| 7 | TempSeq_V\$BNCF | Basonuclein rDNA transcription factor (Poll) | 1 | ctgggactcgTTCcctcg | | |
| 8 | TempSeq_V\$HESF | Vertebrate homologues of enhancer of split complex | 1 | gggaCACGagtccca | | |
| 9 | TempSeq_V\$XBBF | X-box binding factors | 1 | cgagtcccagaGTTAcagg | | |
| 10 | TempSeq_V\$PARF | PAR/bZIP family | 1 | tggggctctGTAactct | | |
| 11 | TempSeq_V\$SRFF | Serum response element binding factor | 1 | tgaacCATAgctgggtcc | | |
| 12 | TempSeq_V\$SRFF | Serum response element binding factor | 1 | gacccagcTATGgttcat | | |
| 13 | TempSeq_V\$PAX6 | PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites | 0,871 | cccttACACatgaaccata | | |
| 14 | TempSeq_V\$CEBP | Ccaat/Enhancer Binding Protein | 1 | gttcaTGTGaaagg | | |
| 15 | TempSeq_V\$YY1F | Activator/repressor binding to transcription initiation site | 1 | agggaaCCATaggcaaccagg | | |
| 16 | TempSeq_V\$CEBP | Ccaat/Enhancer Binding Protein | 1 | accattagGCAAcca | | |
| 17 | TempSeq_V\$PARF | PAR/bZIP family | 0,836 | accattagGCAAccag | | |
| 18 | TempSeq_V\$CEBP | Ccaat/Enhancer Binding Protein | 1 | ctggTTGCctaatgg | ccattagGCAAccag | |
| 19 | TempSeq_V\$PARF | PAR/bZIP family | 0,86 | cctggTTGCctaatgg | accattagGCAAccag | |
| 20 | TempSeq_V\$NOLF | Neuron-specific olfactory factor | 1 | atattTCCCcctgtgttcctaat | attaggcaaccagGGGAaatgat | |
| 21 | TempSeq_V\$OZF | Olfactory associated zinc finger protein | 0,75 | agGCAAccaggggaaat | | |
| 22 | TempSeq_V\$ETSF | Human and murine ETS1 factors | 1 | caaccaggGGAaatgatgaag | | |
| 23 | TempSeq_V\$HNF1 | Hepatic Nuclear Factor 1 | 0,762 | gggAAATgatgaagaag | | |
| 24 | TempSeq_V\$LTSM | Localized tandem sequence motif | 1 | agatcttctCATCa | | |
| 25 | TempSeq_V\$IRXF | Iroquois homeobox transcription factors | 0,75 | tgtaAATGtagat | | |
| 26 | TempSeq_V\$IRXF | Iroquois homeobox transcription factors | 0,75 | tctaCATTtaca | | |
| 27 | TempSeq_V\$RUSH | SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING finger DNA | 0,96 | ctACATtaca | | |
| 28 | TempSeq_V\$RUSH | SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING finger DNA | 0,96 | ccACATtga | | |
| 29 | TempSeq_V\$SRFF | Serum response element binding factor | 0,853 | ctttccacaTTGtaaatg | | |
| 30 | TempSeq_V\$CEBP | Ccaat/Enhancer Binding Protein | 1 | acaaaTGTGaaaga | | |
| 31 | TempSeq_V\$ETSF | Human and murine ETS1 factors | 1 | acaaatgGGAagagttctg | | |
| 32 | TempSeq_V\$P53F | p53 tumor suppressor | 0,753 | ttacaaatgtggaaaGATGttcgtg | | |
| 33 | TempSeq_V\$NFAT | Nuclear factor of activated T-cells | 1 | aaatgGGAagagttctg | | |
| 34 | TempSeq_V\$NFAT | Nuclear factor of activated T-cells | 1 | atgtGGAagagttctg | | |
| 35 | TempSeq_V\$BNCF | Basonuclein rDNA transcription factor (Poll) | 0,842 | tfgggaaagaTGTcgtgg | | |
| 36 | TempSeq_V\$HAND | Twist subfamily of class B bHLH transcription factors | 1 | atgtggaaaGATGtctgggt | | |
| 37 | TempSeq_V\$DMRT | DM domain-containing transcription factors | 1 | tgttcgtggtataTTGtTaa | | |
| 38 | TempSeq_V\$SORY | SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors | 1 | atttaacAAATataccacgaacat | | |
| 39 | TempSeq_V\$HNF1 | Hepatic Nuclear Factor 1 | 1 | ggatattGTTAaatta | | |
| 40 | TempSeq_V\$CART | Cart-1 (cartilage homeoprotein 1) | 1 | cttttAATTaacaataat | | |

15. Bibliografía

Ralph E and Aronson J. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *The Lancet*, 2000; 356(9237):1255-1259.

Stephens MDB. Definitions and classifications of adverse reaction terms. In: Stephens MDB, Talbot JCC, Routledge PA, eds. *The detection of new adverse reactions*, 4th edn. London: Macmillan Reference, 1998: 32–44.

Thong B, Leong K, Tang C and Chung H. Drug allergy in a general hospital: Results of a novel prospective inpatient reporting system. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003; (3):342-7.

Jacoline C, Bruin M and Koopmanschap M. Epidemiology of Adverse Drug Reactions in Europe: A Review of Recent Observational Studies. *Drug Safety*, 2015; (38):437–453.

Lundkvist J and Jönsson B. Pharmacoeconomics of adverse drug reactions. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2004; (18): 275–280.

Sánchez I, Amador C, Plaza JC, Correa G, Amador R. Impacto clínico de un sistema de farmacovigilancia activa realizado por un farmacéutico en el reporte y subnotificación de reacciones adversas a medicamentos. *Revista médica de Chile*, 2014;142(8):998-1005.

Borda I, Slone D, Jick M. Assessment of adverse reactions within a drug surveillance program. *JAMA Network* 1968; 205 (9): 645-647.

Lavan A, Gallagher P. Predicting risk of adverse drug reactions in older adults. *Therapeutic Advances in Drug Safety*. 2016; 7(1):11-22.

Lazarou J, Pomeranz B, Corey P. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *J Am Med Assoc* 1998; 279:1200 –1205.

Demoly P, Bousquet J. Epidemiology of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1:305–310.

Bates W, Leape L and Petrycki S, Incidence and preventability of adverse drug events in hospitalized adults *Journal of General Internal Medicine*, June 1993; (8): 289-294.

Kaushal R, et al. Adverse Drug Events in Pediatric Outpatients. *PLoS One, Ambulatory Pediatrics*, 2012; (3): 383-389.

Sarkar U, López A, Maselli JH, Gonzales R. Adverse Drug Events in U.S. Adult Ambulatory Medical Care. *Health Services Research*. 2011; 46(5):1517-1533.

Gandhi T, Weingart S, Borus J, Seger RP, Peterson J, Burdick E, Shu K, B.A., Frank F, Leape LL and Bates D. Adverse Drug Events in Ambulatory Care. *N Engl J Med* 2003; 348:1556-1564.

Gertler S, Pharm CZ, López A, Stein J and Urmimala S. Root Cause Analysis of Ambulatory Adverse Drug Events That Present to the Emergency Department. *Journal of Patient Safety*, 2016(12):119-124.

Rojas C, Calderón-Ospina CA, Cifuentes Mejía P, Castillo Barreto Ramírez Peinado E. Reacciones adversas a medicamentos como motivo de ingreso al servicio de urgencias de la Clínica Universitaria Teletón. *Cuadernos de medicina en investigación y salud*. 2013.

Calderón C, Urbina A. La Farmacovigilancia en los últimos 10 años: Actualización de conceptos y clasificación. Logros y retos para el futuro en Colombia. *Revista de los estudiantes de medicina de la Universidad Industrial de Santander*. 2011; (1):53-66.

Vallejos A. Reacciones adversas por antibióticos en una unidad de cuidado intensivo pediátrico y neonatal de Bogotá, *Biomédica*. 2007; (27):66-75.

Tribiño G, Maldonado C, Segura O, Díaz J. Costos directos y aspectos clínicos de las reacciones adversas a medicamentos en pacientes hospitalizados en el servicio de medicina interna de una institución de tercer nivel de Bogotá. *Biomédica*. 2006; (26): 31-41.

Segura O, Maldonado C. Las reacciones adversas a medicamentos: una aproximación desde el punto de vista económico. *Biomedica*, 2003;(23):401-7.

INVIMA. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Programa Nacional de Farmacovigilancia. Vol 6 N°1 /2017. Fuente: www.ins.gov.co.

Kaufman G. Adverse drug reactions: classification, susceptibility and reporting. *Nursing Standard* 2016; 30(50):53-63.

Ankur R, Singhraj Y. Adverse drug reactions: An Overview. *International Journal of Pharmacological Research* 2013; (3): 10-12.

Pourpak Z, Fazlollahi M, Fattahi F. Understanding Adverse Drug Reactions and Drug Allergies: Principles, Diagnosis and Treatment Aspects. *Recent patents on inflammation. Allergy Drug Discovery*.2008; (2): 24-46.

Pichler W. Immune Mechanism of drug hypersensitivity. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004; (3):373-97, v-vi.

Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D. C. Dirección de Salud Pública Área de Vigilancia en Salud Pública. *Fundamentos de Farmacovigilancia*. ISBN Primera Edición. 2013.

Riedl A and Casillas A. Adverse Drug Reactions: Types and Treatment Options. *Am Fam Physician*. 2003 1; 68(9):1781-1791.

Baldo B, Pham N.H. (2013) Classification and Descriptions of Allergic Reactions to Drugs. In: Drug Allergy. Springer, New York, NY.

Greener M. Understanding adverse drug reactions: An overview, Nurse Prescribing 2014;(4): 189 -195.

Werner J. Pichler, MD, Dean J. Naisbitt, PhD, and B. Kevin Park, PhD, Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. J Allergy Clin Immunol. 2011; (127):74-81.

Otero J, Rollón Mayordomo A, Coello Suanzes J, Lledó Villar E, Lozano Rosado R, Sánchez-Moliní M et al. Osteonecrosis de los maxilares asociada al uso de bifosfonatos: revisión de ocho casos. Rev Esp Cirug Oral y Maxilofacial [Internet]. 2011;(1): 15-21.

Schyder B and Pichler W. Mechanisms of Drug-Induced Allergy. Mayo Clin Proc.2009; (3): 268-272.

Landsteiner K and Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. The Journal of Experimental Medicine. 1935; (5):643-656.

Schnyder B, Hellweg D, Zanni M, Bettens F and Pichler WJ. Direct, MHC-dependent presentation of the drug sulfamethoxazole to human alphabeta T cell clones. Journal of Clinical Investigation. 1997; (1):136-141.

Golstein P, Ojcius D. M. and Young J. Cell Death Mechanisms and the Immune System. Immunological Reviews, 1991; 121: 29–65.

Peter C. Cell-mediated cytotoxicity, In Cell, 1993; (4): 607-612.

Diaz L, Chiong M, Quest A, Lavandero S and Stutzin A. Mechanisms of cell death: molecular insights and therapeutic perspectives. Cell Death and Differentiation.2005;(12): 1449–1456.

- Orrenius S**, Pierluigi N and Zhivotovsky B. Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology, Toxicological Sciences. 2011; (119): 3–19.
- Wehrli P**, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French LE. Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol*. 2000; (2):141-148.
- Elmore S**. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 2007; 35(4):495-516.
- Vivier E**, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells, *Science*. 2011;(7): 44–49.
- Moretta L**, Ciccone E, Poggi M.C and Moretta A. Origin and functions of human natural killer cells. *Int J Clin Lab*, 1994; 24: 181-186.
- Shi F** and Van Kaer L, Organ-specific features of natural killer cells, *Nat Rev Immuno* 2011; (11):658-671.
- Sun J** and Lewis L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells, 2011; (11): 645-657
- Raulet D** and Russell E. Self-tolerance of natural killer cells. *Nature Reviews Immunology* 2006;(6):520-531
- Gismondi A**, Carlino C, Stabile H, & Santoni A. NK cell and endothelial cell interactions. In *Natural Killer Cells*. Elsevier, 2010; 279-288.
- Vivier E**, Tomasello E, Baratin M and Ugolini. Functions of natural killer cells. *Nature immunology*. 2008;(9): 503-510.
- Yokoyama W**, Plougastel B. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 2003; (3): 1-13

Germain R. T-cell development an the CD 4- CD 8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002; (2): 1-14.

Lai A, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in immunology.* 2008;(4):207-212

Janeway C, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Generation of lymphocytes in bone marrow and thymus.

Vivier E, Pavert S, Cooper M and Belz G. The evolution of innate lymphoid cells. *Nature Immunology* 2016; (17): 790-794.

Koretzky G. Multiplex roles of CD4 and CD8 T cell activation. *J Immunol* 2010; (5): 2643-2644.

Kobayashi K, Van den Elsen P, NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses, *Nature Reviews Immunology,* 2012;(12): 813-820.

Arribas I, *Farmacogenética y Variabilidad Interindividual en la Respuesta a los Medicamentos.* Academia de Farmacia Reino de Aragón. 2010 Zaragoza.

Maggo SDS, Savage RL, Kennedy MA. Impact of New Genomic Technologies on Understanding Adverse Drug Reactions. *Clinical Pharmacokinetics.* 2016; 55:419-436.

Wilke R, Lin DW, Roden DM, et al. Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nature reviews Drug discovery.* 2007; 6 (11):904-916.

Cozza K, Armstrong SC. *The Cytochrome P450 System. Drug Interaction Principles for Medical Practice.* Washington, DC: American Psychiatric Publishing; 2001.

Motsinger-Reif A, Jorgenson E, Relling MV, et al. Genome-Wide Association Studies in Pharmacogenomics: Successes and Lessons. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;(8):383-394.

Kathleen M. Sook WY, Mushiroda T, Richard M., Mark J. and Kubo M. Genome-wide association studies of drug response and toxicity: an opportunity for genome medicine. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 2016;(1): 1.

Génin E, Schumacher M, Roujeau J-C, et al. Genome-wide association study of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in Europe. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011; 6:52.

Thorn C, Klein T, Altman R. PharmGKB: The Pharmacogenomics Knowledge Base. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013; 1015:311-320.

Proyecto PharmaGKB (The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base, <http://www.pharmgkb.org/>).

Scott S. Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics. *Genet Med*. 2011; (12): 987–995.

Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *J Clin Pharmacol*, 2001 (52); 345-347.

Phillips K, Veenstra D, Oren E, Lee Sadee W Potential role of pharmacogenomics in Reducing adverse drug reaction *JAMA* 2001; 286: 2271-79.

Drew L. The right drug for you. *Precision Medicine Pharmacogenetics*.2016; (537):60-62.

Patil J. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: Brief Introduction.*J Pharmacovigilance* 2015, (3):3.

Brockmüller J, Tzvetkov MV. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2008;(2):133-157

Goldberg A, Rizzo L. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. *Einstein, reviewing basic sciences*. 2015;(1):153-6.

Vandiedonck C and Knight J. The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2009. (5): 379-94.

Xian C and Raghavan M. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I antigens. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;(4): 499–504.

Klein J and Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; (10):702-709.

Sung Y. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing and Clinical Implications. *Medical Journal*, 2007: (48): 11-23.

Galindo I, Llerena A and Lopez M. An update on HLA alleles associated with adverse drug reactions. 2017: 1-12.

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>

Thomson G. HLA population genetics. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1991;(2):247-260.

Daly A. Pharmacogenomics of adverse drug reactions. *Genome Medicine*. 2013; (1):5.

Li L, Hu FY and Zhou D. Predictive markers for carbamazepine and lamotrigine-induced maculopapular exanthema in Han Chinese. *Epilepsy Res*. 2013; (1): 296-300.

Zhong J, Yang Y, Lian Y and Wang C. Innate Immunity in the Recognition of β -Cell Antigens in Type 1 Diabetes. *he Center for Biomedical Research*, 2011.

Ronaldson K, McNeil JJ. Improving drug safety by locating genetic markers for hypersensitivity reactions. *Med J Aust.* 2009;(11):641-643.

Faviel F, Gonzalez G, Middleton D and Jones A. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. 2011; (39); 913-919.

Sánchez A and Meyer D. The Relevance of HLA sequencing in Population Genetics Studies. *Journal of Immunology Research* 2014: 1 – 12.

Masahiro T, Akihiro I, Nahoko K, Yoshiro S, Kouichi K and Ryuichi H. Prediction of Severe Adverse Drug Reactions Using Pharmacogenetic Biomarkers. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2010; (2): 122–133.

Pavlos R, Mallal S and Phillips E. HLA and pharmacogenetics of drug hypersensitivity. *Pharmacogenomics.*2012;(11), 1285–1306.

Rivera C, Palma A, Padilla C. La función inmunológica de la piel. *Dermatología Rev Mex* 2008;(5):211-24.

Hans F, Merk, Drugs skin metabolites and allergic drug reaction, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2009;(4):311-315.

Joseph Y, Fuentes C and Orozco TR. Farmacodermias y su relación genotípica. *Dermatología Rev Mex* 2007;(2):73 – 79.

Rendic S, DiCarlo FC, Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their cations, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 1997; (29):413- 80.

Park B, Naisbitt D, Gordon S, Kitteringham N, Pirmohamed M. Metabolic activation in drug allergies, *Toxicology*, 2001; (158): 11-23.

Torre C and Suh Oh HJ. Novedades en el diagnóstico de las toxicodermias. Elsevier España. 4 de febrero de 2013.

Roujeau J, Stern RS. Severe adverse cutaneous reaction to drugs. N. Engl. J. Med. 1994; 331:1272-1285.

Roujeau J, Kelly JP, Naldi L, Rzany B, Stern RS, Anderson T, et al. Medication use and the risk of Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis. N Eng J of Med. 1995;(22):1600–7

Roujeau J. Epidermal necrolysis (Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis): Historical considerations. Dermatologica Sinica, 2013; (31): 169-174.

Stern R, Divito SJ. Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis: Associations, Outcomes, and Pathobiology-Thirty Years of Progress but Still Much to Be Done. The Journal of investigative dermatology. 2017;(5):1004-1008.

Frey N, Jossi J, Bodmer A, Bircher A, Meier CR and Spoendlin J. The epidemiology of Stevens – Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in the UK. J Invest Dermatol. 2017; (6): 1240-1247.

Hsu D, Brieva J, Silverberg NB, Silverberg JI. Morbidity and mortality of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in United States Adults. J Invest Dermatol 2016; 136:1387.

Yang M-S, Lee JY, Kim J, Kim G, Kim B, Kim J, et al. Incidence of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a nationwide population-based study using national health insurance database in Korea. PLoS One 2016; 11(11).

Roujeau J, Bastuji-Garin S. Systematic review of treatments for Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis using the SCORTEN score as a tool for evaluating mortality. Ther Adv Drug Saf. 2011;(3):87–94.

Lars E. Toxic epidermal necrolysis and Stevens Johnson syndrome: our current understanding. *Allergology*, 2006; 55(1): 9-16.

Carle P, Wolkenstein P., Biassette H and Roujeau JC. Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis and Stevens–Johnson syndrome. *British Journal of Dermatology*. 1996; (134): 710-714.

Stern R. Improving the outcome of patients with Toxic Necrolysis and Stevens - Johnson syndrome. *Arch Dermatol* 2000; 136: 410-11.

Roujeau J, Chosidow O, Saiag P, Guillaume JC. Toxic epidermal necrolysis (Lyell syndrome). *J. Am. Acad. Dermatol*. 1990; 23:1039-1058.

Chung W and Hung SI. Recent advances in the genetics and immunology of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrosis. *J Dermatol Sci*. 2012; (3):190-6.

Tohyama M and Hashimoto K. Immunological mechanisms of epidermal damage in toxic epidermal Necrolysis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012; (4): 376-82.

Paul C, Wolkenstein P, Adle H, Wechsler J, Garchon HJ, Revuz J and Roujeau JC. Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis. 1996; (4): 710-4.

Murata J, Abe R, Shimizu H. Increased soluble Fas ligand levels in patients with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis preceding skin detachment. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:992 – 1000.

Verhage M, Sørensen JB. Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 2008; 9 (9): 1414–24.

Chau L, Craig M, and Ypoung E. Perforin: structure and function. *Immunology Elsevier* 1995; (16): 194-201.

Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. Central-European Journal of Immunology. 2014; (1):109-115.

Voskoboinik I, Smyth M and Joseph A. Perforin – mediated target –cell death and immune homeostasis. Nature Reviews Immunology. 2006; (6): 940–952.

Voskoboinik I, Whisstock JC and Joseph A. Perforin and Granzymes: function, disfunction and human pathology. Nature Reviews Immunology ,2015; (15); 388–400.

Cullen S and Martin SJ. Mechanisms of granule-depent killing. Cell Death and Differentiation Nature.2008; (15): 251-262.

Trapani J. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. Genome Biology. 2001; 2(12):1-7.

Bots M and Medema JP. Granzymes at a glance. Journal of Cell Science. 2006;(119); 5011-5014.

Universidad Autónoma de Zacatecas. n.d www.uaz.edu.mx .

Chowdhury D, Lieberman J. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. Annual review of immunology. 2008; 26:389-420.

Shih C and Chung WH. Cytotoxic Proteins and Therapeuctic Targets in Severe Cutaneous Adverse Reactions. 2014; (1): 194-210.

EMBL-EBI ands Trust Sanger Institute. n.d. <https://www.ensembl.org/index.html>.

Clayberger C and Krensky. Grnulysin. Current Opinion in Immunology.2003; (15): 560-565.

Villamor N. Apoptosis: mecanismos celulares e implicaciones clínicas. Haematol ElSevier. 2004 (89): 126-148.

Hanson D, Kaspar A.A., Poulain F.R., Krensky A.M. Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. Mol. Immunol.1999 (36):413-422.

Krensky A, Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue antigens*. 2009; 73(3):193-198.

Anderson D, Sawaya M, Cascio D, Ernst W, Modlin R, Krensky A and Eisberg D. Granulysin Crystal Structure and Structure derived Lytic Mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 2003; (2): 355-365.

Nagasawa M, Ogawa K, Nagat K and Shimizu N. Granulysin and its clinical significance as a biomarker of immune response and NK cell related neoplasms. *World J Hematol*. 2014; (4):128-137.

Krensky A and Clayberh: A novel Host Defense Molecule. *American Journal of Transplantation* 2005; 5: 1789–1792

Takamori Y, Ogawa K, Takano S and Nakamura M. Granulysin induces cell death with nuclear accumulation. *J Med Dent Sci*. 2005;(1):1-7.

Chung W, Hung SI, Yang JY, Wei CY and Chen T. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Nature Medicine*. 2008; (14): 1343 – 1350.

Fujita Y, Yoshioka N, Abe R, Murata J, Hishina D, Mae H and Shimizu H. Rapid immunochromatographic test for serum granulysin is useful for the prediction of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *J Am Acad Dermatol*. 2011; (1): 65-68.

Chung W and Hung SI. Genetic markers and danger signals in stevens-johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Allergol Int*. 2010 ;(4):325-32.

Dominguez M, Landi V, Morera L and Garrido J. Polimorfismo en genes de la inmunidad innata. Análisis funcional. Grupo de Genomica, Universidad de Cordoba. N.d. 2014.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E and Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 1995. 11; (23):4878-84.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M and Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 2005. 1;(13):2933-42.

Tang L, Nogales E, Ciferri C. Structure and Function of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes and Mechanistic Implications for Transcription. *Progress in biophysics and molecular biology.* 2010; (2-3):122-128.

Takahashi S and Licht JD. The human promyelocytic leukemia zinc finger gene is regulated by the Evi-1 oncoprotein and a novel guanine-rich site binding protein. *Nature Leukemia.* 2002; 16: 1755–1762

Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development.* 2013; 140: 4129-4144.

Deng Z, Cao P, Wan M, Sui G. Yin Yang 1: A multifaceted protein beyond a transcription factor. *Transcription.* 2010; 1(2):81-84.

Kaisho T, Tsutsui H, Tanaka T, et al. Impairment of Natural Killer Cytotoxic Activity and Interferon γ Production in Ccaat/Enhancer Binding Protein γ -Deficient Mice. *The Journal of Experimental Medicine.* 1999;(11):1573-1582.

Kida Y, Kuwano K, Zhang Y, Arai S. *Acholeplasma laidlawii* up-regulates granulysin gene expression via transcription factor activator protein-1 in a human monocytic cell line, THP-1. *Immunology.* 2001;(3):324-32.

Kida Y, Shimizu T, Kuwano K. Opposing roles of activator protein-1 and CCAAT/enhancer binding protein beta in the regulation of inducible granulysin gene expression in a human monocytic cell line, THP-1. *Immunology*. 2002;(4):507-16.

Zeni W, Suqing Wang. Role of kruppel-like transcription factors in adipogenesis. *Developmental Biology* 2013; 235–243.

John L, Ward AC. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Mol Immunol*. 2011;(9-10):1272-8.

Jie C, Tang M, Wanglin L, Xie J, Du H, Yuyuani Li. Upregulation of Activator Protein-4 in Human Colorectal Cancer With Metastasis. Article first published online. October 22, 2008.

Dodiuk-Gad R, Chung WH, Laurence V, Shear N. Stevens–Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis: An Update. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2015; (6):475-493.

Chung H, Hyodo-Miura J, Kitayama A, Terasaka C, Nagamune T and Ueno N. Screening of FGF target genes in *Xenopus* by microarray: temporal dissection of the signalling pathway using a chemical inhibitor *Genes to Cells*. 2004; (9): 749–761.

Assier H, Bastuji-Garin S and Revuz J. Erythema Multiforme With Mucous Membrane Involvement and Stevens-Johnson Syndrome Are Clinically Different Disorders With Distinct Causes. *Arch Dermatol*. 1995; 131(5):539-543.

Meneux E, Wolkenstein P, Haddad B, Roujeau JC, Revuz J and Paniel BJ. Vulvovaginal involvement in toxic epidermal necrolysis: a retrospective study of 40 cases. *Obstet Gynecol*. 1998; 91(2):283-7.

Gueudry J, Roujeau J, Binaghi M, Soubrane G, Muraine M. Risk factors for the development of ocular complications of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol.* 2009; 145(2):157-62.

Mockenhaupt M, Viboud C, Dunant A, Naldi L, Halevy S, Bouwes Bavinck JN, Sidoroff A, Schneck J, Roujeau JC, Flahault A. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: assessment of medication risks with emphasis on recently marketed drugs. The EuroSCAR-study. *J Invest Dermatol.* 2008 Jan; 128(1):35-44.

Jeung, Y, Lee J, Oh M, Choi, D. & Lee, B. Comparison of the causes and clinical features of drug rash with eosinophilia and systemic symptoms and Stevens-Johnson syndrome. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2, 123. (2010).

Frey N, Bodmer, M., Bircher, A., Rüegg, S., Jick, S. S., Meier, C. R. and Spoendlin, J. The risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in new users of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2017:1–8.

Laffitte E, Nenadov Beck M, Hofer M, Hohl D and Panizzon RG. Severe Stevens-Johnson syndrome induced by contrast medium iopentol (Imagopaque). *Br J Dermatol.* 2004; 150(2):376-8.

Brown M, Yowler C, Brandt C. Recurrent toxic epidermal necrolysis secondary to iopromide contrast. *J Burn Care Res.* 2013; 34(1): e53-6.

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo – PNUD. CESAR: Análisis de conflictividades y construcción de paz. Julio de 2010.

Grigoryev T, Watkins L, Gao AV, Grant M, StocktonPorter H, Watson R, A. Mathias M, Gittens C, Cheadle K, C. Transcriptomics of Peripheral Blood from Asthmatics Living in Barbados. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; (128): S259.

Chung W, Chang WC, Lee YS et al. Genetic variants associated with phenytoin-related severe cutaneous adverse reactions. *JAMA*. 2014, 6; 312(5):525-34.

Yamanaka R, Kim GD, Radomska S, Lekstrom-Himes J, Smith LT, And. Xanthopoulos K. CCAAT/enhancer binding protein ϵ is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Medical Sciences: Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; (9): 6462–6467.