

**GENOTIPIFICACIÓN DE HLA-B EN PACIENTES COLOMBIANOS
AFECTADOS POR EL SÍNDROME STEVENS-JOHNSON Y LA
NECRÓLISIS EPIDÉRMICA TÓXICA**

MARIA JULIANA LEÓN RUIZ

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD DE GENÉTICA

Bogotá, Agosto 22 de 2014

**GENOTIPIFICACIÓN DE HLA-B EN PACIENTES COLOMBIANOS AFECTADOS POR EL SÍNDROME
STEVENS-JOHNSON Y LA NECRÓLISIS EPIDÉRMICA TÓXICA**

MARIA JULIANA LEÓN RUIZ

**Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de MAESTRÍA
en GENÉTICA HUMANA**

Director: CARLOS MARTIN RESTREPO, MD, MSc, PhD.

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

Bogotá, 2014

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“La universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que con su amor y apoyo incondicional me dieron todas las fuerzas necesarias día a día para que esta meta llegara a su final. A mi abuelita Teresa y a mi tía Esperanza que siempre están pendientes de mi y que con sus pequeños detalles me ayudaron para llegar al final de esta linda etapa. A Kata y en general a toda mi familia León que siempre han estado conmigo colaborándome y dándome las fuerzas necesarias para salir adelante.

A mi ángel en el cielo que me acompaña a diario, que no me desampara y que siempre ha estado junto a mi mostrándome el mejor camino a seguir.

A la Doctora Dora Janeth Fonseca por abrirme las puertas y permitir que a pesar de todos los tropiezos este trabajo llegara a su final, por todas sus enseñanzas y consejos tanto a nivel cognoscitivo como a nivel personal. Gracias por toda la paciencia, la confianza y por su amistad.

A mi director el Doctor Carlos Martin Restrepo por su apoyo incondicional, por compartir una parte de sus grandes conocimientos conmigo, así como por su esfuerzo en la revisión y culminación de este hermoso trabajo.

A los docentes de la unidad de Genética de la Universidad del Rosario por compartir sus conocimientos durante todo este tiempo, en especial al Doctor Paul.

A mis compañeros y amigos de la maestría, Julián, Oscar, Adriana, Eliana y Mónica por todos los momentos compartidos durante este tiempo, por su amistad y sus enseñanzas.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo que me ayudaron de diferentes formas para que todo esto llegara a su fin, en especial a Astrid y a Mireyita por su apoyo y confianza. A mi Cami por ser esa persona tan especial y maravillosa que llego a mi vida cuando menos me lo esperaba y me ha dado todo el animo necesario para culminar de la mejor manera esta gran meta.

Finalmente, un agradecimiento especial a todos los pacientes que hicieron parte de este estudio por que sin su aporte nada de esto podría haber sido realidad.

DEDICATORIA

*A mis padres que han estado siempre junto a mi
dándome su amor y apoyo incondicional.*

Carlos Martín Restrepo Fernández, MD, MSc, PhD.
Director de Tesis

Dora Janeth Fonseca Mendoza, MSc.
Co-directora de Tesis

Juan Guillermo Chalela Mantilla, MD.
Jurado

Ricardo Miguel Luque Bernal, MD, MSc.
Jurado

Nora Constanza de Jesús Contreras Bravo, MSc
Coordinadora Maestría Genética Humana

Carlos Martín Restrepo Fernández, MD, MSc, PhD
Director Maestría Genética Humana

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 OBJETIVO GENERAL	4
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
4. MARCO TEORICO.....	5
4.1 REACCIÓN ALÉRGICA A MEDICAMENTOS (RAM)	5
4.2 MECANISMOS DE LAS ALERGIAS PRODUCIDAS POR FÁRMACOS	9
4.2.1 <i>Concepto Hapteno y Pro-hapteno</i>	9
4.2.2 <i>Concepto de interacción farmacológica de los medicamentos con receptores del sistema inmune (Concepto p-i)</i>	12
4.3 LA PIEL COMO ÓRGANO PRINCIPALMENTE COMPROMETIDO	15
4.3.1 <i>Formas clínicas de RAM cutáneas</i>	15
4.3.1.1 Síndrome Stevens-Johnson y Necrólisis Epidérmica Tóxica.....	16
4.4. SEÑALES CITOTÓXICAS Y MOLÉCULAS INMUNES EN SJS O NET.....	18
4.4.1 <i>Vía dependiente de exocitosis</i>	18
4.4.1.1 Perforina/Granzima B	18
4.4.1.2 Granulinsina.....	19
4.4.2 <i>Vía de interacción celular con Fas-FasL</i>	20
4.4.3 <i>Otras citoquinas/quimioquinas involucradas en la inmunidad celular de SJS o NET</i>	22
4.5 ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO (HLA) Y LA FARMACOGENÉTICA DE LA HIPERSENSIBILIDAD A MEDICAMENTOS	22
4.5.1 <i>Estructura y función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I</i>	22
4.5.2 <i>Alelos de HLA-B y las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos</i>	25
5. HIPÓTESIS.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1. TIPO DE ESTUDIO	30
6.2. UNIVERSO Y MUESTRA	30
6.3 MÉTODOS DE LABORATORIO	30
6.3.1 <i>Estudio de ADN genómico</i>	30
6.3.1.1 Extracción de ADN.....	30
6.3.1.2 Genotipificación Alelos HLA-B	31
6.3.1.3 Análisis de datos.....	34
7. ASPECTOS ETICOS.....	35
8. RESULTADOS	36
8.1 CORRELACIÓN CLÍNICA Y CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES.....	36
8.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL ADN GENÓMICO ESPECIFICO DEL LOCUS B AMPLIFICADO	37
8.3 ASIGNACIÓN DE ALELOS DEL <i>LOCUS</i> HLA-B	39
8.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	40

8.4.1 Frecuencias Alélicas.....	40
8.4.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	42
8.4.3 Análisis molecular de varianza (AMOVA).....	43
8.4.4.1 Análisis AMOVA en poblaciones de América	43
8.4.4.2 Análisis AMOVA en poblaciones de Colombia.....	45
9. DISCUSIÓN	47
10. CONCLUSIONES	58
11. PERSPECTIVAS.....	59
12. BIBLIOGRAFIA.....	60

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. <i>CLASIFICACIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS A LOS MEDICAMENTOS (RAM)</i>	6
TABLA 2. <i>CLASIFICACIÓN REACCIONES INMUNOLÓGICAS (HIPERSENSIBILIDAD)</i>	7
TABLA 3. <i>SUBCLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES TIPO IV</i>	8
TABLA 4. <i>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES COLOMBIANOS CON RAM CUTÁNEAS SEVERAS</i>	37
TABLA 5. <i>GENOTIPIFICACIÓN DE PACIENTES COLOMBIANOS AFECTADOS POR RAM CUTÁNEAS SEVERAS</i>	40
TABLA 6. <i>FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA-B</i>	41
TABLA 7. <i>COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y LA ASOCIACIÓN CON LOS MEDICAMENTOS O SUSTANCIAS SUMINISTRADAS A LOS PACIENTES CON SJS, NET Y SJS/NET</i>	41
TABLA 8. <i>FRECUENCIAS ALÉLICAS LOCUS HLA-B EN DIFERENTES GRUPOS POBLACIONALES DE AMÉRICA</i>	44
TABLA 9. <i>COMPARACIÓN PAREADA ENTRE POBLACIONES DE AMÉRICA</i>	45
TABLA 10. <i>FRECUENCIAS ALÉLICAS LOCUS HLA-B EN DIFERENTES POBLACIONES COLOMBIANAS</i>	45
TABLA 11. <i>COMPARACIÓN PAREADA ENTRE POBLACIONES COLOMBIANAS</i>	46

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. RECONOCIMIENTO DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS POR COMPUESTOS PORTADORES DE FÁRMACOS (CONCEPTO HAPTENO/PROHAPTENO).....	10
FIGURA 2. CONCEPTO HAPTENO Y PROHAPTENO	11
FIGURA 3. METABOLISMO DEL SULFAMETOXAZOL EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE Y SU PAPEL EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T	12
FIGURA 4. CONCEPTO DE INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA DIRECTA DE LOS MEDICAMENTOS CON RECEPTORES DEL SISTEMA INMUNE	13
FIGURA 5. COMPARACIÓN DE MECANISMOS DE ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS T POR ANTÍGENOS PEQUEÑOS.....	14
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL DESPRENDIMIENTO EPIDÉRMICO EN SJS, SJS/NET Y NET.....	17
FIGURA 7. MODELO DE INTERNALIZACIÓN DE MOLÉCULAS LÍTICAS.....	19
FIGURA 8. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE FAS. LA SEÑALIZACIÓN DE FAS SE ACTIVA EN LAS CÉLULAS BLANCAS INDUCIDA POR LA UNIÓN DE FASL A LA MEMBRANA POR EL RECEPTOR DE MULTI-TRIMERIZACIÓN	21
FIGURA 9. EVOLUCIÓN CLÍNICA Y SÉRICA DE sFASL EN NET.....	21
FIGURA 10. ESQUEMA DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.	23
FIGURA 11. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES CLASE I Y b MICROGLOBULINA.....	24
FIGURA 12. ESTRUCTURA DEL MHC CLASE I.....	24
FIGURA 13. NOMENCLATURA DE LOS ALELOS DE LOS GENES DEL SISTEMA HLA.	26
FIGURA 14. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	32
FIGURA 15. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA EN LOS PACIENTES 1 A 19	38
FIGURA 16. EJEMPLO DE ASIGNACIÓN DE ALELOS DE HLA-B POR MEDIO DE UType®.....	39
FIGURA 17. RESULTADOS TEST DE HARDY-WEINBERG POR POBLACIÓN.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
AMOVA	Análisis molecular de varianza
APC	Células presentadoras de antígenos
β_2m	β_2 -microglobulina
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
FADD	Proteína del dominio de muerte asociada a <i>Fas</i>
<i>Fis</i>	Coeficiente de endogamia
HLA	Antígeno leucocitario humano
HW	Test de equilibrio de Hardy-Weinberg
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferón γ
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MPO	Mieloperoxidasas
NET	Necrólisis Epidérmica Tóxica
NK	Células natural killer
OMS/WHO	Organización mundial para la salud
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
RAM	Reacciones adversas a medicamentos
SCT	Superficie corporal total
SJS	Síndrome Stevens-Johnson
SMX	Sulfametoxazol
SMX-NO	Sulfametoxazol nitroso
SMX-NHOH	Sulfametoxazol hidroxilamina
SRA	Sitio de reconocimiento del antígeno
TCR	Receptor de células T
TCR-$\alpha\beta$	Receptor para células T- $\alpha\beta$
T_H1	Linfocitos T ayudadores 1
T_H2	Linfocitos T ayudadores 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
TNF-R	Receptor de TNF tipo I
TRAIL-Rs	Receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

1. INTRODUCCIÓN

La farmacogenética es la rama de la medicina que estudia los factores genéticos responsables, entre otros, de la variabilidad de respuesta y la eficacia de los medicamentos¹. El conocimiento actual muestra que polimorfismos y variaciones genómicas influyen la respuesta interindividual a los medicamentos, por lo que es una herramienta útil para no solo individualizar el tratamiento, sino también, reconocer variantes que son determinantes de susceptibilidad a reacciones adversas ¹.

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) definidas por la Organización Mundial para la Salud (OMS/WHO) como “la respuesta nociva e involuntaria a un medicamento que ocurre a la dosis normalmente usada como profilaxis, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad”, son consideradas como un problema de salud pública debido a la alta morbilidad y mortalidad¹⁻³. Si bien a pesar de que el daño producido por los medicamentos puede ocurrir en cualquier órgano, la piel es el más susceptible debido a su extensión, superficialidad y vascularización¹.

En la actualidad, se desconocen con precisión los mecanismos implicados en la patogénesis de las RAM cutáneas severas; no obstante, se ha informado en la literatura que ciertos factores genéticos podrían estar implicados; esto se debe, entre la diversa evidencia, a la identificación de gemelos monocigóticos a quienes se les administró el mismo medicamento y ambos mostraron una RAM, por lo cual se ha propuesto una etiología de tipo hereditario⁴.

Las bases genéticas de las de las RAM se clasifican en dos amplios grupos. El primero, tiene que ver con los genes implicados en mecanismos farmacológicos (genes objetivos y transportadores de medicamentos o enzimas metabolizadoras), en los cuales los efectos adversos se manifiestan por el acúmulo del fármaco o sus metabolitos en el órgano blanco⁵. Un segundo grupo de genes involucra al sistema inmunitario mediante una reacción alérgica que es inducida por el medicamento; distintos genotipos del sistema de *Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA)*, se asocian con estas reacciones y son detonadores de una respuesta inmune que, mediante la presentación de antígenos al receptor de las células T, eliminan las células diana⁵.

Dentro de las RAM cutáneas, algunas son muy severas y pueden comprometer la vida de los pacientes. En ellas se encuentran el Síndrome Stevens-Johnson (SJS) y la Necrólisis Epidérmica Tóxica (NET). Estos padecimientos se presentan a través de una reacción inmune que es secundaria a la administración de un medicamento y que, según los

estudios, se inicia por linfocitos T citotóxicos (CTLs) controlados por una vía de restricción del HLA^{1,6}.

Se ha observado que tanto SJS como NET se presentan tras la administración de distintos tipos de fármacos incluyendo, dentro de los más comunes, medicamentos anticonvulsivantes y antibióticos. Los anticonvulsivantes que se han asociado comúnmente a estas reacciones son aquellos que contienen anillos aromáticos tales como carbamazepina, fenitoína y lamotrigina⁶. Los pacientes con SJS ó NET presentan clínicamente un exantema de desarrollo rápido, aparición de flictenas y maculas purpúreas, compromiso de las mucosas seguido del desprendimiento de la piel y representado microscópicamente por la apoptosis masiva de queratinocitos^{7,8}. En la actualidad se considera al SJS y a la NET como variantes del fenotipo del mismo desorden que se presentan con severidad diferente. El diagnóstico de SJS se establece cuando el compromiso cutáneo es menor del 10% de la superficie corporal total, mientras que el de NET se propone cuando la afección alcanza más del 30%; se ha considerado además, un fenotipo intermedio, llamado SJS/NET cuando el compromiso se halla entre el 10 y el 30%)^{6,9,10}.

Se han propuesto mecanismos para explicar la muerte de los queratinocitos en las RAM cutáneas severas, uno es la hipótesis de la interacción de antígenos de los medicamentos con proteínas del HLA, cuya combinación es presentada a los receptores de las células T (concepto hapteno/prohapteno o el concepto p-i) y el otro mecanismo se deriva de la activación de receptores de muerte celular en los queratinocitos por la vía Fas-FasL, perforina/granzima B y granzulina^{6,7}.

Recientemente, se ha puesto atención a las variaciones del genotipo del sistema HLA como fuente de susceptibilidad para RAM cutáneas severas. Los estudios han mostrado asociación entre algunos alelos del gen B del HLA de la clase I (HLA-B) con SJS o NET, que se iniciaron después de la administración de distintos fármacos (HLA-B*15:02 con carbamazepina; HLA-B*58:01 con alopurinol y HLA-B*57:01 con abacavir); sin embargo, estas asociaciones no se han podido reproducir en todas las poblaciones estudiadas, lo que sugiere una relación divergente entre poblaciones^{5,6,11-13}.

El presente estudio aborda precisamente esta problemática. Se propone ver si en nuestra población existe asociación de susceptibilidad a SJS, SJS/NET o NET con alelos del gen B del HLA de la clase I.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) son una causa importante de morbilidad en el mundo, aquellas que presentan un compromiso cutáneo severo afectan a una minoría de pacientes (tasa de incidencia global del 2-3%); no obstante, a pesar de ser poco frecuentes tienen gran impacto en la salud pública debido a la elevada morbilidad y mortalidad^{1-3,14}.

A pesar de los avances en la identificación de mecanismos implicados en su patogénesis es poco lo que se sabe hasta el momento. En los últimos años se ha observado asociación entre el riesgo de RAM cutáneas severas luego de la administración de algunos medicamentos con la presencia de alelos de HLA de la clase I; por ejemplo, se habla de la asociación del alelo HLA-B*57:01 y la susceptibilidad para el desarrollo de RAM cutáneas luego de la administración de abacavir^{15,16}.

Sin embargo, aún existe controversia frente a la asociación de otros alelos del HLA de la clase I con medicamentos tales como carbamazepina o alopurinol en las poblaciones humanas. Distintos estudios han mostrado asociación entre HLA-B*15:02 con carbamazepina o también HLA-B*58:01 con alopurinol, pero este hallazgo no es universal y no se reproduce en todas las poblaciones estudiadas, por lo que se hace necesario estudiar a todas las poblaciones no estudiadas hasta la fecha y otros *loci* que puedan ser los responsables de las RAM cutáneas severas en otras poblaciones^{5,11-13}.

En Colombia no existen este tipo de estudios, ni con los alelos descritos para el gen B del HLA de la clase I, ni con otros alelos candidatos a causar RAM cutáneas severas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Realizar el primer tamizaje a nivel genómico en pacientes colombianos con SJS, SJS/NET o NET medicamentoso que permita una mejor comprensión de los mecanismos etiopatológicos de la enfermedad.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar mediante análisis de secuenciación, las variantes del sistema HLA-B en pacientes colombianos con SJS, SJS/NET o NET para establecer posibles asociaciones genéticas con el fenotipo.
- Comparar los resultados de los análisis de secuenciación del sistema HLA-B de pacientes colombianos con SJS, SJS/NET o NET con las bases de datos de HLA-B en Colombia y América.
- A partir de la descripción clínica de los pacientes que permita valorar si hay asociaciones entre las variantes del sistema HLA-B y la severidad del fenotipo.
- Establecer las variantes de HLA-B en nuestra población como marcadores moleculares predictivos de la enfermedad.

4. MARCO TEORICO

4.1 Reacción Alérgica a Medicamentos (RAM)

Las reacciones alérgicas a medicamentos (RAM) son entidades importantes para la práctica clínica, porque son el diagnóstico diferencial de una amplia variedad de patologías debido a que afectan cualquier sistema del organismo e imitan cualquier tipo de enfermedad¹⁴.

La Organización Mundial para la Salud (WHO) define las RAM como aquella respuesta nociva e involuntaria a un medicamento, la cual ocurre a las dosis normales utilizadas como profilaxis, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad³; son consideradas como un importante problema para la salud pública por ser una amenaza para la vida².

Se han realizado muchos estudios con el fin de estimar la incidencia de las RAM, no obstante esta varía ampliamente, probablemente debido a las diferencias en la metodología utilizada para detectar presuntas reacciones e inclusive diferencias en su definición. En general, las admisiones a los hospitales debidas a RAM oscilan entre el 0.3 y el 11%¹⁴.

En los Estado Unidos, se estima que pueden producir alrededor de 100.000 muertes al año, así como, un incremento considerable en la estancia hospitalaria, lo que representa un costo aproximado de USD 2.500 por paciente, sumando así el 5 al 9% de los costos hospitalarios en este país^{1,17,18}.

Inicialmente las RAM fueron clasificadas dentro de dos grandes grupos: las *reacciones de tipo A*, las cuales incluyen aquellas respuestas tanto normales como aumentadas, pero no deseadas, a los fármacos en cuestión y que normalmente tienen relación con la dosis administrada; y las *reacciones de tipo B*, las cuales no guardan una relación con la acciones farmacológicas conocidas de los fármacos en cuestión, se deben habitualmente a mecanismos inmunológicos o farmacogenéticos y guardan o no una relación con la dosis de administración¹⁴.

Esta clasificación sencilla no permite encajar con claridad algunos tipos de reacciones adversas, por lo que se han sugerido otras formas adicionales de organización, para un total de seis (Tabla 1)³. No obstante, la ampliación no elimina todas las dificultades de clasificación, esto debido a que están centradas únicamente en las propiedades de los medicamentos; por tal motivo, se ha propuesto una nueva aproximación que tiene en cuenta las propiedades de la reacción (como el tiempo de aparición y la severidad), así como características propias del individuo (genéticas o patológicas, entre otras). Este es el llamado sistema de clasificación tridimensional (DoTS), el cual relaciona la dosis del medicamento, la evolución a través del tiempo y la predisposición de cada paciente¹⁹.

Tipo de Reacción	Características	Manejo
A: Relación Dosis	• Común • Relación con la acción farmacológicas del medicamento • Predecible • Baja mortalidad	• Reducir o suspender • Considerar efectos de terapia concomitante
B: No relación Dosis	• Rara • No relacionado a la acción farmacológica del medicamento • No Predecible • Alta mortalidad	• Suspender
C: Relación Dosis y Tiempo	• Rara • Relacionada con acumulación de dosis	• Reducir dosis o suspender
D: Relación Tiempo	• Rara • Usualmente relacionada con la dosis • Se produce o se hace evidente algún tiempo después de su uso	• Con frecuencia intratable
E: Cese de Administración	• Rara • Se produce poco después de la retirada del medicamento	• Reintroducir o retirar gradualmente
F: Falla inesperada de tratamiento	• Común • Relación dosis • Con frecuencia producida por interacción de medicamentos	• Aumentar la dosis • Considerar efectos de tratamiento concomitante

Tabla 1. Clasificación de los Efectos Adversos a los Medicamentos (RAM)

Modificado de Edwards, IR et al. 2000³

A pesar de que la aplicación práctica de estas clasificaciones en el ámbito clínico puede llegar a ser compleja, se puede afirmar que la mayoría de las RAM (85–90%) son del tipo A. Las alergias a medicamentos se encuentran clasificadas dentro de las reacciones del tipo B y representan el 5–10% de todas las RAM. Las reacciones de tipo B se clasifican, a su vez, en reacciones de hipersensibilidad en las cuales se encuentra involucrado un mecanismo inmunológico (IgE, células T, reacciones citotóxicas o complejos inmunes), y las reacciones de hipersensibilidad sin mecanismo comprobado (5 al 10% del tipo B)²⁰.

La *hipersensibilidad* es aquella respuesta inmunitaria exagerada o exacerbada a un agente (inmunógeno), la cual se presenta tras la exposición a un estímulo en dosis que son toleradas por las demás personas^{14,21}. En estas reacciones inmunológicas (hipersensibilidad) están implicados los cuatro mecanismos inmunológicos propuestos por Coombs y Gell en 1963 y son clasificadas como se observa en la Tabla 2.

Tipo de Reacción	Características
Tipo I	Formación complejo fármaco/antígeno-IgE que se une a receptores de las células cebadas y basófilos. - Liberación inmediata de mediadores químicos (histamina, leucotrienos) - Las manifestaciones clínicas incluyen: Prurito, urticaria, angioedema, broncoconstricción y anafilaxia. - Los fármacos que las producen son: ácido acetilsalicílico, opioides, penicilinas, vacunas.
Tipo II	Reacciones citotóxicas. Mecanismos mediados por IgG o IgM. - El anticuerpo se fija a la célula y se produce la consecuente fijación del complemento y lisis celular. - Ocurre en las discrasias de células hemáticas como la anemia hemolítica y la trombocitopenia.
Tipo III	Mediadas por inmunocomplejos intravasculares - El fármaco antigénico y los anticuerpos normalmente IgG o IgM están presentes de manera simultánea en circulación. - La retirada lenta de los inmunocomplejos por los fagocitos conduce a su depósito en la piel y en la microcirculación renal, articular y del sistema gastrointestinal. - Son ejemplos la enfermedad del suero y la vasculitis.
Tipo IV	Mediada por células T. Reacciones de hipersensibilidad retardadas. - Son ejemplos típicos la dermatitis de contacto o las pruebas cutáneas retardadas de la tuberculina. - Las debidas a medicamentos incluyen el Síndrome Stevens-Johnson y la Necrólisis Epidérmica Tóxica.

Tabla 2. Clasificación Reacciones inmunológicas (Hipersensibilidad)

Modificado de Lee, A. 2007¹⁴

Como fue publicado por el estudio de Thong y colaboradores en Singapur, en el año 2003, se reportan las manifestaciones cutáneas como la presentación clínica mas común de las RAM (95.7%), se propuso a los antibióticos y los antiepilépticos como los medicamentos causales en un 75% de todas las RAM; dentro de estas, las reacciones adversas mas serias como el Síndrome Stevens-Johnson (SJS) y la Necrólisis Epidérmica Tóxica (NET), que se presentaron en un 5.2%^{2,22}.

Este tipo de reacciones de hipersensibilidad cutánea severa (exantemas bullosos) se encuentran clasificadas dentro del mecanismo inmunológico del Tipo IV (Tabla 2), que son mediadas por células T. Sin embargo, algunos estudios refieren que las reacciones inmunológicas pueden implicar mecanismos combinados o mixtos y que las células T participan en los cuatro tipos de reacción²³.

Tanto los exantemas bullosos (SJS y NET) como los exantemas maculo-papulares, presentan fenómenos de infiltración de células T, de sobre-regulación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en queratinocitos, presencia de células T inmigrantes y la expresión de IL (interleucina)-5 en las lesiones. No obstante, los dos tipos de exantemas muestran diferencias significativas en el porcentaje de células T CD8+ perforina positivas

que se encuentran en la dermis y en particular en la epidermis de pacientes con exantemas bullosos²³.

Se ha propuesto inicialmente que el complejo perforina/granzima B es el responsable de la citotoxicidad mediada por células que ocasiona la muerte masiva de queratinocitos. Se piensa que este complejo potencia el proceso de muerte celular directo entre la célula T y la célula blanco, lo cual explicaría el escaso infiltrado celular que se encuentra en la histopatología de la NET. Por esta razón se han propuesto otras funciones de las células T en la hipersensibilidad a medicamentos, que conducen a más presentaciones clínicas, sugiriendo que la reacción de tipo IV pueda ser además sub-clasificada en cuatro subgrupos²³ (Tabla 3).

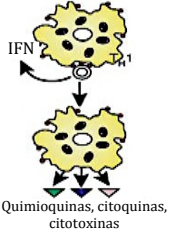
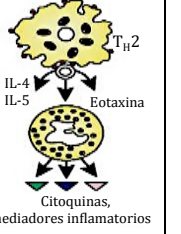
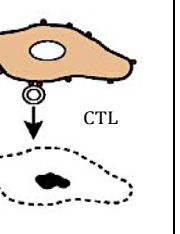
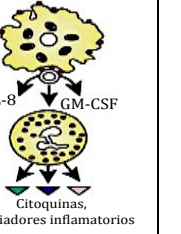
	Tipo IVa	Tipo IVb	Tipo IVc	Tipo IVd
Reactante inmune	IFN γ , TNF α (Células T _{H1})	IL-5, IL4/IL-13 (Células T _{H2})	Perforina/Granzima B (CTL)	CXCL-8 GM-CSF (Células T)
Antígeno	Antígeno soluble presentado por las células o estimulación directa de células T	Antígeno soluble presentado por las células o estimulación directa de células T	Antígeno asociado a células o estimulación directa de células T	Antígeno soluble presentado por las células o estimulación directa de células T
Célula Efectora	Activación de macrófagos	Eosinófilos	Células T	Neutrófilos
				
Ejemplo de reacción de hipersensibilidad	Reacción de tuberculina, dermatitis de contacto (con Tipo IVc)	Asma crónica, rinitis alérgica crónica, exantema maculopapular con eosinofilia	Dermatitis de contacto, exantema maculopapular y bulloso, hepatitis.	Enfermedad de Behcet, exantema pustuloso generalizado agudo

Tabla 3. Subclasificación de las reacciones Tipo IV. Las reacciones del tipo IV son dependientes de citoquinas y se definen dentro de cuatro sub-tipos llamados desde el a hasta d. Las del *Tipo IVa* corresponden a reacciones con Linfocitos T ayudadores 1 (T_{H1}), alta secreción de IFN- γ /TNF- α y la activación de monocitos/macrófagos; a menudo se observa reclutamiento de células CD8 (como en la reacción del Tipo IVc). Las reacciones del *Tipo IVb* muestran inflamación por eosinófilos que responden a Linfocitos T ayudadores 2 (T_{H2}), con secreción de altos niveles de IL-4, IL-5 y IL-13; a menudo están asociadas a reacciones del Tipo I mediadas por IgE. Las reacciones citotóxicas del *Tipo IVc* (por células CD4 y CD8) dependen de las células T citotóxicas, como células efectoras, y están presentes en todas las reacciones de hipersensibilidad relacionadas con medicamentos. El *Tipo IVd* corresponde a células T dependientes y reacción inflamatoria de los neutrófilos; la respuesta se presenta, como en las infecciones bacterianas pero se diferencia por la producción de CXCL-8/GM-CSF por las células T (CXCL-8=factor quimiotáctico de neutrófilos IL-8; GM-CSF=factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos).

Tomado y modificado de Pichler, WJ. 2004²³

La sub-clasificación de las reacciones del tipo IV considera la producción de diversas citoquinas por las células T, incorpora la clasificación de células T ayudadoras (T_H1/T_H2), incluye la actividad citotóxica de las células T, CD4 y CD8, y enfatiza en la participación de diferentes células efectoras tales como monocitos, eosinófilos y macrófagos, las cuales al final son las causantes de la inflamación y el daño a los tejidos²³.

Con esta sub-clasificación se puede inferir que la mayoría de las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos que comprometen la piel de forma severa (SJS y NET) estarían dentro del tipo IVc, en el cual, las células T actúan por si mismas como las células efectoras, que migran y matan a las células de los tejidos blanco (hepatocitos o queratinocitos) de una forma dependiente de perforina/granzima B (Tabla 3)²³.

4.2 Mecanismos de las alergias producidas por fármacos

Las alergias a medicamentos son ejemplos de reacciones inmunes a compuestos moleculares pequeños; en la mayoría se encuentran involucradas las células T CD4+ y CD8+ las cuales reconocen estos compuestos por la vía del receptor para células T- $\alpha\beta$ (TCR- $\alpha\beta$), en la vía dependiente del MHC, originando una reacción de hipersensibilidad^{24,25}.

En general, moléculas menores a 1000 Da (1 KDa), no son inmunogénicas por si mismas, normalmente se degradan, metabolizan y eliminan sin estimular una respuesta inmune^{17,24,26,27}. A pesar de ello, compuestos pequeños como los medicamentos, son capaces de desencadenar una respuesta inmune por parte de las células T; por lo que se han propuesto tres mecanismos, como explicación a este fenómeno²⁷⁻³⁰:

El primero, el concepto del hapteno, en donde se requiere que compuestos químicamente reactivos se unan de forma covalente a una molécula mas grande, ya sea un péptido o una proteína, que la hace capaz de ser reconocida por el sistema inmune²⁹. El segundo, el concepto de pro-hapteno, en donde compuestos que no son químicamente reactivos se metabolizan hacia compuestos reactivos para llegar a ser haptenos³¹. Finalmente, el mas reciente, el concepto de la interacción farmacológica de los medicamentos con receptores del sistema inmune (concepto p-i), el cual se basa en que algunos fármacos presentan características estructurales específicas que permiten la interacción directa con las células T, sin mediación de hapteno²⁴.

4.2.1 Concepto Hapteno y Pro-hapteno

El origen del hapteno se dio en estudios realizados por parte de Landsteiner y Jacobs en 1935 al identificar la relación entre la reactividad de alérgenos químicos hacia proteínas y

su potencial de sensibilización^{28,32}; el concepto se ha revisado y refinado para abarcar la hipersensibilidad a medicamentos de forma amplia.

El hapteno es aquella pequeña molécula (<1 KDa) químicamente reactiva que se une de forma covalente con proteínas o péptidos, ocasionando una modificación de la proteína o del péptido, que a su vez, es el responsable de generar una reacción inmunogénica²³. Una vez formado el complejo hapteno o fármaco-proteína, es reconocido por las células dendríticas, las cuales lo toman y procesan en pequeños fragmentos que posteriormente serán asociados con las moléculas del MHC para ser presentados a receptores de células T (TCR) específicos (Figura 1)²⁸⁻³⁰.

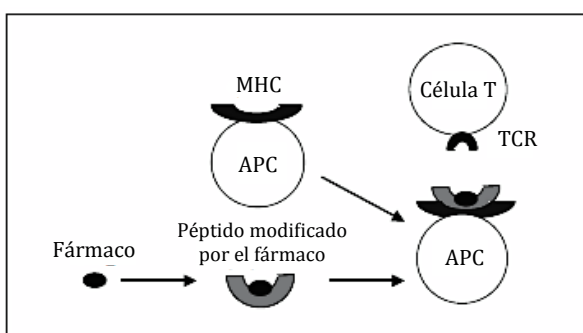


Figura 1. Reconocimiento de células T específicas por compuestos portadores de fármacos (concepto hapteno/prohapteno). El compuesto portador de fármacos es presentado a las células presentadoras de antígenos (APC) en donde las células T con su apropiado receptor de células T (TCR) las reconoce. MHC = Complejo mayor de histocompatibilidad. Tomado y modificado de Schnyder, B et al. 2009³⁰

Centrados en esta hipótesis se asume que el hapteno (fármaco) tiene que ser químicamente activo y capaz de llevar a cabo la unión covalente con la proteína o el péptido. En el caso de no ser un fármaco químicamente reactivo, requiere de la activación a través del metabolismo; este es el concepto conocido como hipótesis del pro-hapteno²⁹.

Los antibióticos betalactámicos, entre ellos la penicilina, son un claro ejemplo de un hapteno (Figura 2). Ellos espontáneamente generan la unión covalente estable entre el fármaco y los residuos de lisina de las proteínas, completando un paso obligatorio en la sensibilización inmune; sin embargo, el sitio y el número de modificaciones requeridas por el fármaco para generar una respuesta inmune aún se encuentra poco definido^{28,29}.

En contraste, un ejemplo típico de un pro-hapteno es el *sulfametoxazol (SMX)*, un antibiótico bacteriostático tipo sulfonamida de amplio espectro de acción y amplia distribución en los tejidos; el cual no es reactivo por si mismo y requiere ser activado a través del metabolismo intracelular a nivel hepático (Figura 2)²⁹. La activación se lleva a cabo en el hígado, órgano que se encuentra altamente expuesto a elevadas cantidades de

metabolitos; sin embargo, no es este uno de los principales órganos blanco para las reacciones de hipersensibilidad asociadas al SMX, como si lo es la piel. Esto se debe a que el hígado posee mecanismos inmunológicos reguladores que impiden el desarrollo de una respuesta inmune, es rico en moléculas como glutatión y antioxidantes que detoxifican los metabolitos reactivos antes de que puedan formar determinantes antigénicos²⁸.

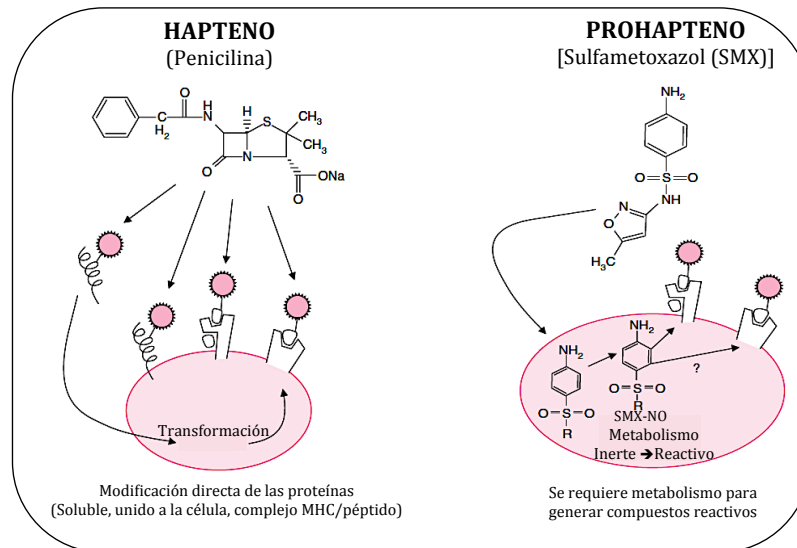


Figura 2. Concepto hapteno y prohapteno. Haptenos como los fármacos (penicilina), se unen covalentemente a moléculas, tanto unidas a células como solubles e incluso al péptido inmunogénico/MHC (Izquierda). Los Pro-haptenos requieren del metabolismo para convertirse en haptenos (químicamente reactivos)(Derecha). Tomado y modificado de Pichler, W J et al. 2002³¹

Normalmente, el SMX es metabolizado por N-acetiltransferasas y N-glucoroniltransferasas hepáticas hacia metabolitos no tóxicos³³. No obstante, una pequeña fracción del fármaco se puede convertir, por medio de una reacción catalizada por proteínas del citocromo P450 y/o mieloperoxidasas (MPO), en un metabolito del tipo hidroxilamina, (*sulfametoxazol hidroxilamina* o *SMX-NHOH*)³⁴; el cual, puede posteriormente ser oxidado en un compuesto nitroso (*sulfametoxazol nitroso* o *SMX-NO*)(Figura 3)³⁵.

Estudios como los realizados por Lavergne y colaboradores demuestran que las células del sistema inmune (monocitos o células dendríticas), pueden metabolizar el SMX al compuesto nitroso durante procesos infecciosos cuando están presentes factores patológicos como: endotoxinas bacterianas, proteínas virales, citoquinas o estrés oxidativo³⁵. Seguidamente, el SMX-NO se une a grupos tiol de las proteínas celulares, las modifica covalentemente y las hace reconocibles por el sistema inmune como antígenos nuevos capaces de generar una respuesta inmune por parte de las células T (Figura 3)^{28,33}.

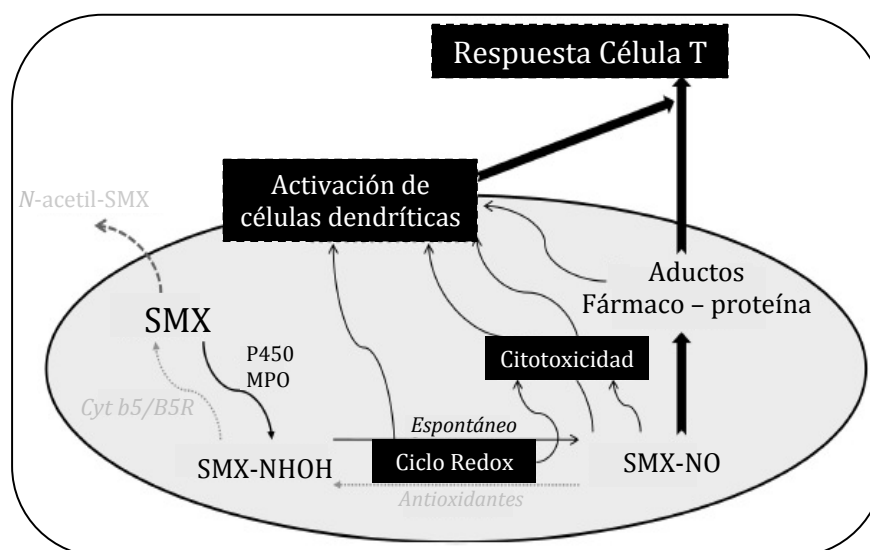


Figura 3. Metabolismo del Sulfametoxazol en células del sistema inmune y su papel en la activación de células T. Cyt b5/B5R = citocromo b5 reductasa. Tomado y modificado de Lavergne, S N et al. 2009³⁵

4.2.2 Concepto de interacción farmacológica de los medicamentos con receptores del sistema inmune (Concepto p-i)

Recientemente Pichler y colaboradores²⁴, han propuesto una tercera posibilidad para el reconocimiento de fármacos por parte de las células T, la cual no requiere de la biotransformación hacia un compuesto químicamente reactivo.

Este mecanismo, conocido como la interacción farmacológica de los medicamentos con receptores del sistema inmune (p-i), postula que los fármacos pueden interactuar directamente con receptores inmunes, como lo hacen con otros receptores y omitiendo la necesidad de un mediador que pueda estimular células inmunes²⁷. Se basa, en aquellos fármacos químicamente inertes, incapaces de unirse de forma covalente a proteínas o péptidos, pero que pueden activar directamente cierto tipo de células T, siempre y cuando posean TCR específicos para interactuar con el medicamento^{23,24,36}.

El primer paso para generar una respuesta inmune de este tipo, es la asociación de fármacos químicamente inertes con el MHC de una manera lábil, esta unión no estimula a la célula por sí sola pero sirve tan solo como un eslabón de unión con un segundo receptor o TCR²⁴. La interacción con el TCR, constituye el segundo paso, en el cual se presenta una gran afinidad por el receptor que genera una señal de tipo inmunológica al reaccionar con la célula T (Figura 4)^{24,30}.

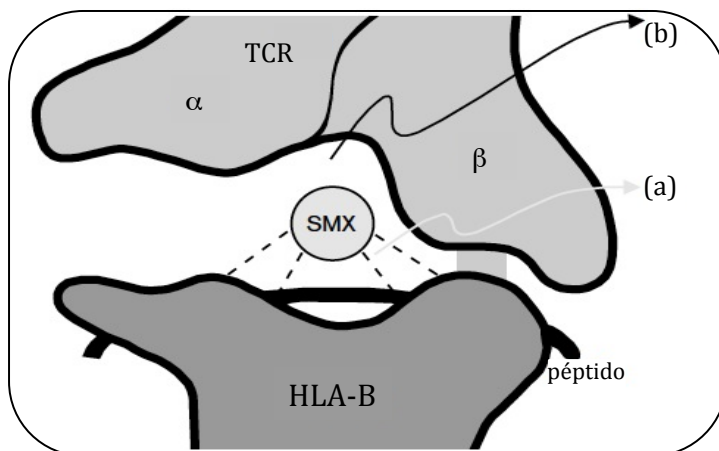


Figura 4. Concepto de interacción farmacológica directa de los medicamentos con receptores del sistema inmune. Un medicamento como el SMX puede unirse al complejo MHC. Esta unión es de baja afinidad y probablemente sin una consecuencia funcional. (a) Puede transmitir una señal a través del TCR adecuado, en su camino hacia cribar las moléculas del MHC, previa unión y estabilización del complejo. (b) La posterior interacción farmacológica con el receptor inmune, permite la activación celular, la cual se interpreta como estimulación antigénica. Tan solo aquellas células inmunes que poseen TCR apropiados reaccionarán. Tomado y modificado de Pichler, W J. 2002²⁴

La completa activación de la célula T por el medicamento requiere la interacción de TCR con el MHC sobre la APC. Este hallazgo, permite hacerse dos preguntas: ¿El fármaco se une primero a la molécula MHC y modifica su estructura, para ser posteriormente percibido por el TCR y ocurre así la activación específica?, o por el contrario, ¿El fármaco se une primero a un TCR específico y traduce la interacción con el MHC tan solo como una señal complementaria?²⁷.

Ambos conceptos pueden ser posibles: la respuesta de las células T CD4⁺ puede ocurrir tanto si el fármaco interactúa primero con el TCR como si ocurre primero la interacción con las moléculas MHC de clase I. Esto se debe a que, en el primer caso se puede romper la unión de TCR con el péptido MHC sin que se afecte la activación celular³⁷. Así mismo, para la completa estimulación de las células CD4⁺ se requiere solo la unión con ciertos determinantes de la estructura del MHC²⁷. Al mismo tiempo, el fármaco se une primero a las moléculas del MHC de clase I y subsecuentemente se produce una fuerte respuesta inmune mediadas por células CD8⁺²⁷.

En soporte al concepto p-i, se tienen el estudio *in vitro* realizado por Schnyder y colaboradores en 1997³⁶ en donde se exponen clones de células T a fármacos como SMX, encontrando que el fármaco puede ser presentado a las células T sin ningún proceso, esto porque las APC fijadas con glutaraldehído, incapaces de procesar antígenos, pueden presentar el SMX y estimular células T específicas de manera restringida por el MHC³⁶.

Así mismo, el reconocimiento del SMX parece ser independiente del metabolismo del fármaco puesto que en estos mismos estudios, no se encuentra una reacción cruzada con otras sulfonamidas con las cuales se tiene, en parte, metabolitos en común. Tampoco se requiere de una unión covalente para el reconocimiento del SMX; parece ser que la unión del SMX con el MHC es inestable (Figura 5), puesto que al realizar lavados, las APC suprimen su capacidad de presentación de antígenos, esto tal vez debido a que el lavado remueve el fármaco del MHC^{26,36}.

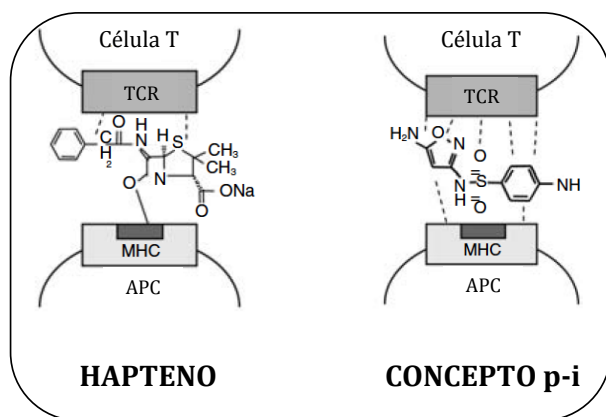


Figura 5. Comparación de mecanismos de estimulación de células T por antígenos pequeños. Uniones covalentes fuertes entre el antígeno, el MHC y el TCR se indican con líneas sólidas, mientras que interacciones no covalentes se representan con líneas punteadas. Para los *haptenos* la mayoría de la energía de unión al antígeno se deriva de la interacción con el complejo MHC a través de pocos pero fuertes enlaces covalentes. Para el *concepto p-i*, algunos fármacos derivan la mayor parte de su energía de enlaces débiles, no hay interacciones covalentes con el TCR. Tomado y modificado de Pichler, WJ et al. 2006²⁶

De esta forma, se podría revelar el porque la mayoría de alergias a SMX se recuperan con la suspensión de la administración del medicamento, lo cual sería difícil de explicar, si el principal evento en la reacción alérgica fuera la unión covalente a proteínas (teoría del hapteno), puesto que la mayoría de las proteínas tienen una vida media larga (albúmina sérica >20 días)³⁶.

Por otra parte, el concepto p-i podría dar una explicación al compromiso predominante de la piel en reacciones mediadas por células T como respuesta a la administración sistémica de medicamentos. La piel posee una alta concentración de células T de memoria, las cuales actúan como células guardianes que pueden ser rápidamente estimuladas por antígenos, además, posee una amplia red de células dendríticas que actúan como APC expresando MHC y predestinando a la piel como el órgano a ser afectado por reacciones de hipersensibilidad³⁰.

4.3 La piel como órgano principalmente comprometido

La piel, es el principal órgano implicado en las reacciones alérgicas a compuestos de bajo peso molecular. Existen dos razones que explican este fenómeno: primero, la piel posee células dendríticas (APC) que son capaces de llevar a cabo reacciones de hipersensibilidad. Segundo, la piel posee las enzimas necesarias para metabolizar compuestos xenobióticos (compuestos sintetizados en el laboratorio) de especies altamente reactivas, los cuales pueden unirse a compuestos de alto peso molecular que desencadenan sensibilización por medio de la formación de haptenos³⁸.

Los queratinocitos humanos, expresan varios transportadores asociados a enzimas metabólicas dependientes del Citocromo P450 (CYP450), los cuales tienen la capacidad de activar y transportar compuestos xenobióticos entre los que se incluyen los fármacos. Los metabolitos producidos en la piel difieren de aquellos producidos a nivel hepático (Fase 1 del metabolismo de compuestos xenobióticos en queratinocitos), esto debido a que CYPs como CYP2E1 se expresa en el hígado y en la piel y otros como CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6 y CYP3A5 se expresan exclusivamente a nivel cutáneo³⁸.

El desequilibrio que se puede presentar entre las fases del metabolismo de compuestos xenobióticos en la célula, lleva a que los intermediarios allí formados (alta reactividad), se unan a moléculas de alto peso molecular (proteínas), e induzcan así una respuesta de sensibilización³⁸. Los estudios muestran la formación de uniones covalentes por el *SMX-NHOH* en queratinocitos humanos normales, incluso en la ausencia de células muertas; estas observaciones llevan a plantear el papel de los queratinocitos normales en el inicio y la propagación de una respuesta de hipersensibilidad cutánea a medicamentos y al mismo tiempo ubican a la piel como un órgano blanco en las reacciones alérgicas a medicamentos^{38,39}.

4.3.1 Formas clínicas de RAM cutáneas

Como se ha informado, las reacciones cutáneas representan una expresión frecuente de las alergias a medicamentos, tienen una tasa de incidencia global de 2-3% en pacientes hospitalizados¹⁴; comprenden un amplio espectro de manifestaciones clínicas así como características histopatológicas distintas, algunas de ellas aparecen rápidamente después de la ingesta del medicamento (urticaria o angioedema), mientras que otras se presentan de forma más retardada (exantemas maculopapulares, bullosos o pustulares)^{29,40}.

Aunque la mayoría de las erupciones cutáneas relacionadas con fármacos no son graves, algunas pueden serlo e incluso pueden llegar a ser potencialmente mortales tal es el caso del angioedema, la eritrodermia, el SJS, SJS/NET y NET. Las erupciones debidas a fármacos

pueden presentarse como una parte del espectro de afectación de múltiples órganos y pueden tener tanto un origen patogénico inmunológico como no inmunológico¹⁴.

Las reacciones cutáneas debidas a causas inmunológicas son motivo de múltiples estudios actualmente, son menos frecuentes y equivalen al resultado de una reacción de hipersensibilidad en la que subyace un mecanismo inmunológico. Por otra parte, las reacciones cutáneas debidas a causas no inmunológicas son más frecuentes e incluyen la toxicidad acumulada al fármaco, sobredosificación, fotosensibilidad e interacciones farmacológicas¹⁴.

4.3.1.1 Síndrome Stevens-Johnson y Necrólisis Epidérmica Tóxica

El SJS, SJS/NET y NET son reacciones severas a medicamentos, caracterizadas por una baja incidencia pero con una alta tasa de mortalidad, inicialmente descritas de forma separada, pero que actualmente y como ya se dijo, se consideran variantes del mismo proceso patológico, difiriendo únicamente en la severidad de presentación^{8,10,41}. Se estima que la incidencia de SJS es de aproximadamente 6 casos por millón de personas por año, mientras que la de NET es aproximadamente 2 casos¹⁰.

Se han identificado mas de 220 medicamentos asociados con el desarrollo de SJS, SJS/NET o NET. Los fármacos mas frecuentemente implicados son antibióticos de primera línea, anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) y anticonvulsivantes^{41,42}. Entre los primeros, las sulfonamidas son las mas fuertemente relacionadas, otros antibióticos incluyen aminopenicilinas, quinolonas, cefalosporinas y tetraciclinas. Para estos medicamentos el riesgo de desarrollar la reacción se ha reportado mayor durante la primera semana de inicio del tratamiento; mientras que para los anticonvulsivantes este riesgo es durante las 2 primeras semanas¹⁰.

Las primeras descripciones de SJS se dieron en 1922, cuando dos médicos estadounidenses, Stevens y Johnson, reportaron dos casos en niños con fiebre asociada a estomatitis severa, conjuntivitis purulenta severa y máculas purpúreas con centros necróticos diseminadas en la piel⁴¹. El termino de Necrólisis Epidérmica Tóxica fue usado por primera vez por el dermatólogo escocés Alan Lyell en 1956, el cual indicaba un raro desorden que compromete la vida, caracterizado por una amplia y rápida evolución de desprendimiento epidérmico, eritema y necrosis⁴¹.

Actualmente se define, por consenso, que el desprendimiento epidérmico en SJS representa los casos con menos del 10% de compromiso superficie corporal total (SCT); mientras que

en NET este es mayor al 30% y aquellos casos en que se encuentra un compromiso intermedio se denominan SJS/NET “solapado” o mixto (Figura 6)^{8,41}.

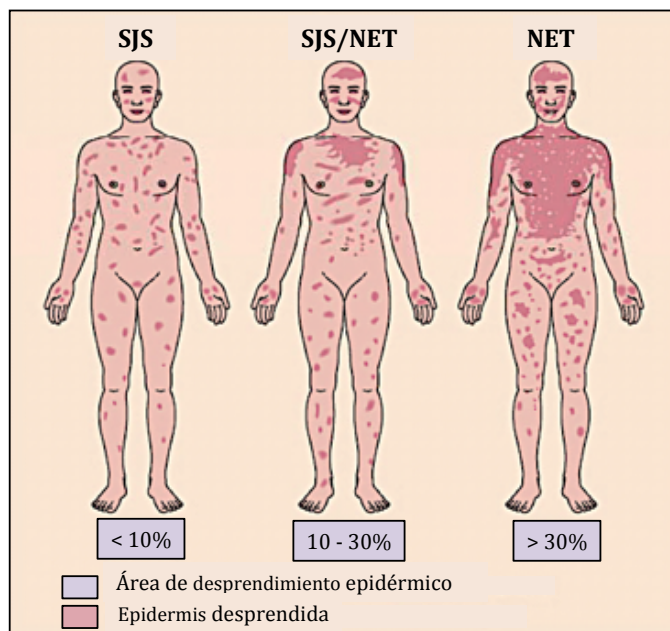


Figura 6. Representación gráfica del desprendimiento epidérmico en SJS, SJS/NET y NET.

Tomado y modificado de Harr, T et al. 2010⁸

Los síntomas iniciales de ambas patologías pueden ser fiebre, escozor en los ojos, dolor al pasar alimentos, tos, vómito, diarrea, mialgias y malestar general, cualquiera de los cuales precede a las manifestaciones cutáneas por 24 a 72 horas. Las lesiones en la piel tienden a aparecer primero en el tronco, esparciéndose posteriormente por el cuello, cara y región proximal de extremidades superiores¹⁰. Las regiones distales de los miembros superiores y los miembros inferiores son relativamente respetados; sin embargo, las palmas y plantas se pueden ver afectadas de una forma temprana. El eritema y la erosión de la mucosa bucal, ocular y genital se presenta en más del 90% de los pacientes ^{8,10,41,43}.

Las manifestaciones cutáneas se caracterizan por un rash eritematoso macular bulloso con centro oscuro, un halo rojo mas claro y máculas de color rojo con ampollas en el centro⁴¹. Estas lesiones rápidamente exhiben el signo de Nikolsky (separación epidérmica inducida por presión ligera de la superficie de la piel); posteriormente, largas capas de epidermis se separan de la dermis evidenciando un desprendimiento localizado que se extiende rápidamente^{10,41}. Luego del periodo agudo, pueden quedar secuelas a nivel ocular o cutáneo; las más frecuentes son: hipo o hiperpigmentación de la piel (62.5%), ojo seco (46%), distrofia de las uñas (37.5%), triquiasis (16%) y simbléfaron (14%), entre otras⁸.

4.4. Señales citotóxicas y moléculas inmunes en SJS o NET

La hipótesis central para explicar la severidad de las lesiones mucocutáneas del SJS o NET, se basa en la apoptosis masiva de queratinocitos mediada por células T⁴⁴. Los estudios revelan que células inmunes, CTLs y células *natural killer* (NK) se encuentran involucradas en la inmunopatogénesis de la reacción, puesto que se observa una infiltración masiva de estas células en las lesiones de piel de los pacientes con NET^{45,46}.

Hasta el momento se han descrito tres vías que pueden estar involucradas en la apoptosis celular de queratinocitos en pacientes con SJS/NET: a) la vía dependiente de exocitosis, en la cual participan moléculas como perforinas, granzimas y granulisina; b) la vía mediada por la unión intercelular con Fas-FasL y c) el entrecruzamiento entre TNF y su receptor de tipo I (TNF-R)^{6,46,47}.

4.4.1 Vía dependiente de exocitosis

Esta vía se establece a través de señales intracelulares luego del reconocimiento de la célula blanco por un linfocito citotóxico (NK o CTLs). En la exocitosis o degranulación, están presentes microtúbulos de movilización que permiten que los gránulos preformados viajen hacia el punto de contacto con la célula blanco, liberando las moléculas líticas almacenadas en los gránulos como perforina, granzimas y granulisina, que inducen apoptosis⁴⁷.

4.4.1.1 Perforina/Granzima B

Estudios realizados por Posadas y cols. 2002, evidencian altas concentraciones durante la fase aguda de la reacción, de perforina y granzima B en las muestras de sangre periférica y en los fluidos de ampollas de pacientes con RAM cutáneas severas, esto sugiere una respuesta citotóxica mediada por células T efectoras⁴⁸. Así mismo, Nassif y cols., en el mismo año, mostraron que los efectos citotóxicos producidos por los linfocitos que se encuentran en los fluidos de las ampollas de los pacientes con NET hacia los queratinocitos, puede ser atenuada por la inhibición de la expresión de perforina/granzima B pero no por anticuerpos monoclonales anti-Fas⁴⁹.

Almacenados en gránulos secretores de células NK y CTLs activados, se encuentran la perforina y la granzima B. La perforina actúa al unirse a la membrana de la célula blanco y forma un canal que promueve la entrada de la granzima B en los queratinocitos. Una vez penetrada la célula, se activa una cascada de caspasas que produce apoptosis celular (Figura 7)^{6,46,47}. La evidencia indica que probablemente la perforina no es esencial para la entrada de proteasas a la célula blanco; sin embargo, esta si se requiere para la citólisis; por

lo que se han propuesto otros modelos de acción en los que participa manosa 6 fosfato y calcio para facilitar el ingreso de la granzima B⁴⁷.

La granzima B puede inducir apoptosis rápidamente a través de dos mecanismos; el primero, activando directamente la caspasa 3, que promueve la fragmentación del ADN y de la membrana nuclear, ambos componentes cruciales del citoesqueleto celular. El segundo mecanismo de disfunción mitocondrial y muerte celular es estimular la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa clivando a Bid, una molécula de la familia Bcl-2 que induce la liberación del citocromo-C mitocondrial, sustancia importante en la formación del apoptosoma y activación de la caspasa 9, que activa luego a caspasa 3⁴⁷.

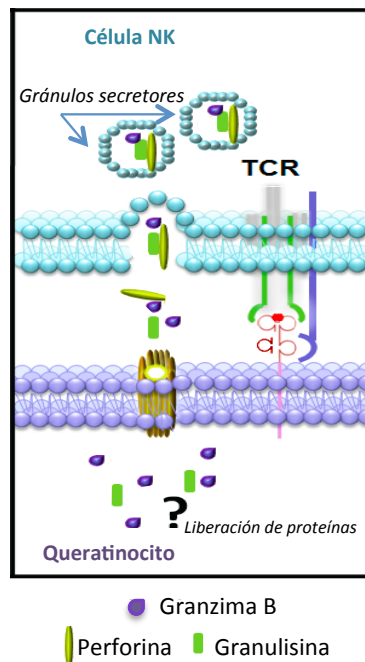


Figura 7. Modelo de internalización de moléculas líticas. La perforina se polimeriza sobre la membrana de la célula blanco formando un poro a través del cual la granzima B y la granulicina entran e inducen apoptosis. Tomado y modificado de Chávez-Galán et al 2009³⁷

4.4.1.2 Granulicina

Recientemente, Chung y cols. 2008, encontraron que la excreción de la proteína *granulicina* juega un papel importante como molécula citotóxica mayor y responsable de la amplia apoptosis de queratinocitos con una alta expresión en las células de flictenas de pacientes con SJS/NET⁵⁰. La *granulicina* es una proteína catiónica pequeña (15-kDa en el precursor y 9-kDa en la forma activa), perteneciente a la familia de proteínas similares a la saposina, la cual actúa como una molécula citolítica que se secreta extracelularmente por CTLs y células NK, a través de una vía de exocitosis^{6,46,47}.

La actividad lítica y el daño ocurren en la célula blanco cuando la *granulisin* interactúa con cargas negativas de la membrana lipídica mitocondrial, se libera citocromo C y disminuye la función (Figura 7)⁴⁷; también se ha observado otro mecanismo por el cual la *granulisin* induce la muerte celular y es a través de la activación de la caspasa 3⁴⁷.

El alto nivel de *granulisin* en las lesiones de flictenas de la piel explica la escasa infiltración de células mononucleares en la histopatología del SJS o NET y que resulta en una extensa necrosis epidérmica^{6,50}. En adición al efecto citotóxico, también se ha demostrado que la *granulisin* es una proteína quimio-atrayente de linfocitos T, monocitos y otras células inflamatorias y activa la expresión de varias citoquinas dentro de las que se destacan la IL-1, IL-6, IL-10 y el INF- γ ^{6,46}.

4.4.2 Vía de interacción celular con Fas-FasL

Se sabe que los queratinocitos expresan receptores *Fas*, aunque no existe evidencia que estos receptores están asociados con la muerte de estas células durante la diferenciación terminal, los estudios de inmunohistoquímica han demostrado que *Fas* se localiza en la membrana basal y supra basal de los queratinocitos primarios y diferenciados en la epidermis normal humana. Este receptor de muerte celular es funcional tras la activación con *FasL*, induciendo la apoptosis⁵¹.

Viard y cols. 1998 fueron los primeros en reportar que las interacciones *Fas-FasL* causan la apoptosis de los queratinocitos en los pacientes con NET⁵²; además de describir que así como *FasL* se expresa en células T activadas y NK, al igual de *Fas* también se expresa en queratinocitos de pacientes con NET^{51,53}. De esta forma, el incremento en la expresión de *FasL* y la conservación de los niveles de expresión de *Fas* comandan la apoptosis que caracteriza a los pacientes con NET⁵¹.

En detalle, la unión *FasL-Fas* recluta la llamada proteína del dominio de muerte asociada a *Fas* (FADD); FADD tiene afinidad tanto por el receptor de muerte (*Fas*) como por la pro-caspasa 8. Establecida la unión pro-caspasa 8 FADD, se genera la auto-activación masiva de caspasa 8 y se desencadena la cascada de caspasas que dan como resultado la degradación del ADN intracelular y la subsiguiente apoptosis celular (Figura 8)^{6,46,51}.

El *FasL* soluble (*sFasL*) se escinde a partir de *FasL* por medio de una enzima metaloproteínasa de matriz, presente en los queratinocitos, la cual tiene el potencial de mediar apoptosis^{46,53}. Viard y cols. demostraron elevación de las concentraciones de *sFasL* en todos los pacientes con NET, lo que no se observa en pacientes con reacciones

medicamentosas menos severas como el eritema multiforme o en los controles; lo que lleva a pensar que *sFasL* es capaz de inducir apoptosis y RAM cutáneas severas^{52,53}.

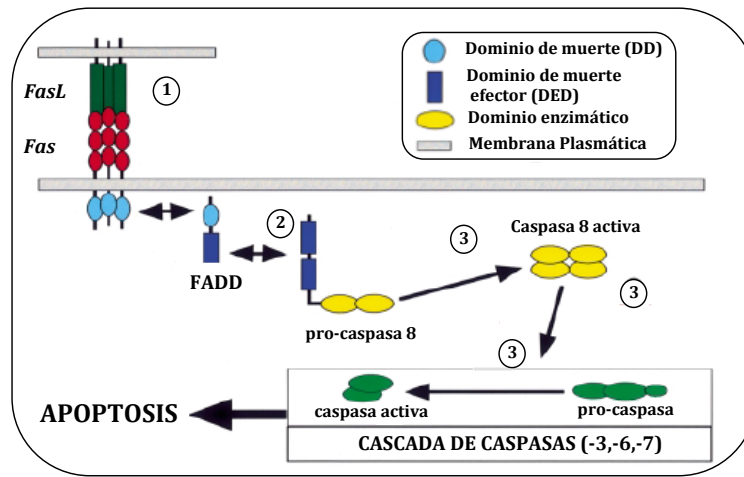


Figura 8. Vía de señalización de Fas. La señalización de Fas se activa en las células blanco inducida por la unión de FasL a la membrana por el receptor de multi-trimerización. Tomado y modificado de Wehrli P et al 2000⁵¹.

Estos resultados no fueron replicados por Abe, quien buscaba identificar correspondencia entre el nivel de *sFasL* y el grado de desprendimiento epidérmico; sin embargo observó que la evolución clínica de NET se relacionaba con los niveles *sFasL* y concluyó que este se producía en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y que podría ser un buen indicador para el diagnóstico temprano de SJS o NET (Figura 9)^{53,54}. Se ha reportado que el *sFasL* sérico también puede estar elevado en otras enfermedades (hepatitis B) por lo que si bien, juega un papel importante en la patogénesis de SJS o NET otros factores también pueden estar relacionados⁵⁴.

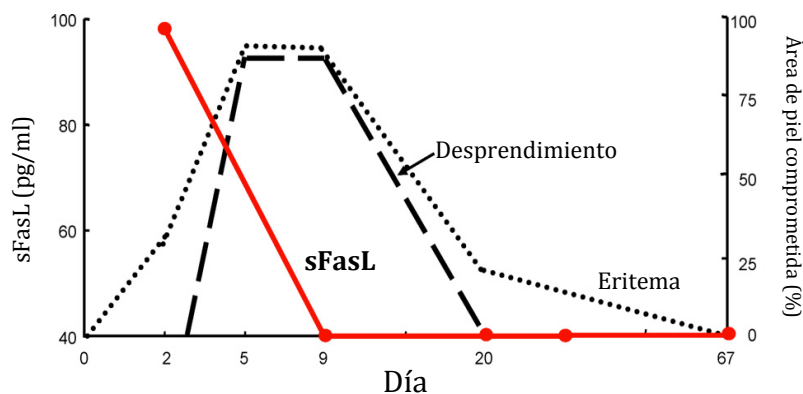


Figura 9. Evolución clínica y sérica de *sFasL* en NET. El eritema y el desprendimiento epidérmico se instauran de una forma temprana y subsecuentemente van aumentando de una forma gradual. El FasL soluble no es detectado inmediatamente se instaura el cuadro, se eleva cuando solo esta presente el eritema sin presentarse aún el desprendimiento epidérmico. Tomado y modificado de Abe, 2008⁵³

4.4.3 Otras citoquinas/quimioquinas involucradas en la inmunidad celular de SJS o NET

Hay evidencia del papel de citoquinas/quimioquinas en las reacciones inmunes de SJS o NET; los estudios hallaron aumento en los niveles de expresión de estas proteínas en las lesiones de piel, fluidos de flictenas, células de flictenas, células mononucleares periféricas o el plasma de pacientes con SJS o NET⁶. Dentro de estas citoquinas/quimioquinas se incluyen el IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-12, entre otras, las cuales pueden ser responsables del tráfico, proliferación, regulación o activación de células T, así como de otros leucocitos que se encuentran activos en SJS o NET⁶.

4.5 Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y la farmacogenética de la hipersensibilidad a medicamentos

Por largo tiempo, se ha observado que hay variación inter-individual entre la respuesta individual a un medicamento con respecto a la eficacia y a los efectos adversos. Un amplio número de explicaciones se han propuesto para estas variaciones, incluyendo la diversidad individual de la farmacocinética y farmacodinamia, concomitante con el uso del medicamento, la enfermedad en curso y los factores ambientales. Sin embargo, durante los últimos años se ha puesto gran atención sobre la genética de la respuesta a los medicamentos, como causa de dicha variación interpersonal^{3,55}.

El área mas probable del ADN para variaciones genéticas que predispongan a reacciones de hipersensibilidad a medicamentos es la región del HLA; esto debido a que es una región en la cual están contenidos diversos genes altamente polimórficos asociados con la función inmune; de estos, el gen del *HLA-B*, es altamente polimórfico con más de 200 variantes reportadas en el genoma humano^{5,55}.

4.5.1 Estructura y función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I

El MHC comprende una cohorte poligénica y polimórfica de genes, los cuales se encuentran involucrados en el reconocimiento inmune. Han evolucionado para maximizar la eficacia y flexibilidad de sus funciones, las cuales, se basan en la unión a péptidos derivados de patógenos microbianos que posteriormente serán presentados a células T^{56,57}. Las proteínas MHC son dímeros insertados en la membrana plasmática que sobresalen hacia el lado extracelular⁵⁷.

El locus del MHC en humanos ocupa una pequeña región en un único cromosoma (6p21.31) la cual abarca 4 Mb^{55,57,58}. Los genes del locus del MHC se encuentran organizados en tres

grupos de acuerdo a la estructura y las propiedades inmunológicas de sus respectivos productos. Las regiones genómicas en donde se encuentran localizados los genes clase I y II marcan los límites del locus y los genes de la clase III se localizan en medio de los anteriores (Figura 10)⁵⁸. Los genes de clase I y II corresponden a los genes del HLA, descubiertos por su importancia en los trasplantes entre individuos no emparentados; estos genes codifican proteínas de la superficie celular que ejercen un importante papel en el desencadenamiento de la respuesta inmunitaria, mas específicamente en la presentación de antígenos a los linfocitos⁵⁹. Los genes de clase III incluyen genes que codifican componentes del complemento tales como C2, C4 y el factor B; así como el TNF- α , una citoquina que induce apoptosis celular y procesos inflamatorios⁵⁷.

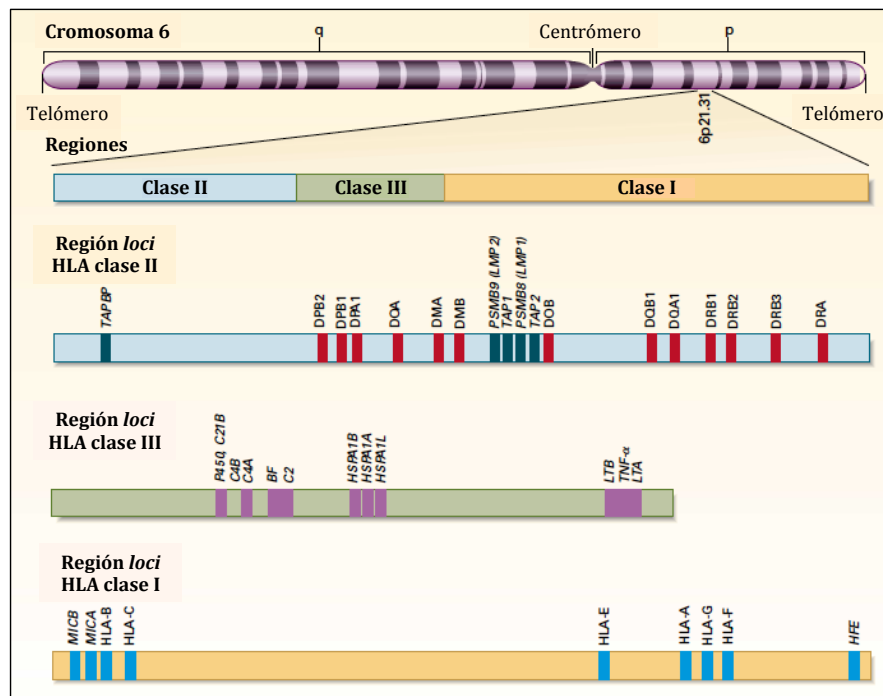


Figura 10. Esquema del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Tomado y modificado de Klein J et al. 2000⁵⁸

Los genes de la clase I (*HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*) codifican proteínas que son parte integrante de la membrana plasmática de todas las células nucleadas^{57,59,60}. La organización de estos genes está basada en la estructura de sus productos: el primer exón codifica la secuencia líder (se separa de la proteína durante el paso de la membrana); los siguientes tres exones, codifican para los dominios externos de la proteína ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente); el quinto exón, codifica el dominio transmembrana y los últimos tres exones, codifican juntos el dominio citoplásmico (Figura 11)⁵⁷.

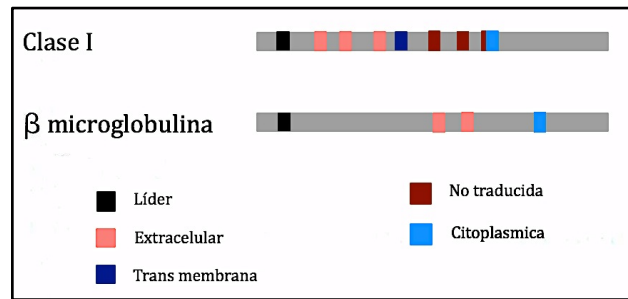


Figura 11. Organización de los genes clase I y β microglobulina. Cada exón representa un dominio de la proteína. Copiado y modificado de Krebs et al. 2011⁵⁷

La mayoría de los polimorfismos que se presentan en los genes de clase I, se presentan en los exones 2 y 3, de forma más específica en la región que codifica para los residuos de aminoácidos del sitio de reconocimiento del antígeno (SRA) lo que lleva a la especificidad en la unión del péptido⁶¹. Entre los exones 2 y 4 la heterocigosidad de los aminoácidos en la posición del SRA es del 20.8%, con una frecuencia de cambios no sinónimos alta, mientras que en otras posiciones esta heterocigosidad es del 3.1%, con un exceso de cambios silentes⁶¹. El exón 4 es altamente conservado debido a que este codifica el dominio $\alpha 3$, importante para dar el soporte estructural a la proteína⁵⁷.

Las proteínas del MHC de clase I consisten en heterodímeros compuestos por una cadena pesada (α) y una cadena liviana que aporta otra proteína llamada β_2 microglobulina (β_2m); en los humanos, existen tres clases de cadenas $I\alpha$ (HLA-A, HLA-B y HLA-C)⁵⁷. La cadena α pesa 45 kD, consta de 3 dominios externos (llamados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de ~ 90 aminoácidos cada uno), un dominio transmembrana (~ 40 residuos) y un dominio corto citoplasmático (~ 30 residuos) (Figura 12)^{56,57}.

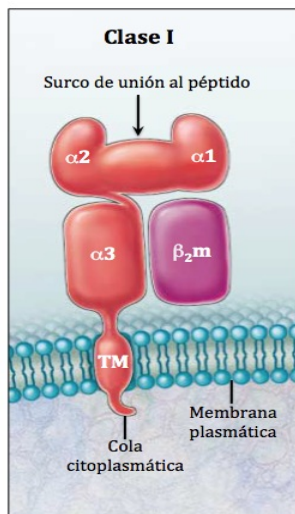


Figura 12. Estructura del MHC Clase I. La cadena α de las moléculas de clase I poseen dos dominios de unión al péptido ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), un dominio similar a la inmunoglobulina ($\alpha 3$), la región transmembrana (TM) y la cola citoplasmática. La β_2m es la cadena liviana de las moléculas de clase I. Tomado y modificado de Klein J et al 2000⁵⁸

Desde el punto de vista funcional, los dominios externos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ además de ser los sitios de unión al péptido mantienen contacto directo con el TCR- $\alpha\beta$, lo que permite el reconocimiento de las moléculas estableciendo las bases de la restricción del MHC clase I⁶⁰. El dominio $\alpha 3$ es un soporte estructural que se conecta con los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, mediante los residuos superiores; los residuos a lo largo de la cadena se comunican con la β_2m y un bucle largo contiene el sitio de unión para el CD8⁶⁰.

El gen β_2m se halla fuera del MHC, en el cromosoma 15: tiene cuatro exones: el primero codifica la secuencia líder; el segundo codifica la mayoría de la proteína (del aminoácido 3 al 95); el tercer exón codifica los cuatro últimos aminoácidos y algo de la región UTR y, el último exón codifica el resto de la UTR (Figura 11)⁵⁷. La proteína β_2m , de 12 kD, tiene una doble función, sirve de transportador hacia la superficie celular del heterodímero (α - β_2m) y ayuda a expresar la función inmune mediante la unión estable del péptido⁶⁰.

4.5.2 Alelos de HLA-B y las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos

Una de las características distintivas del sistema HLA es el alto nivel de polimorfismo exhibido por los *loci* de clase I y clase II. Se han descrito más de 8500 alelos para los *loci* de clase I, de estos, alrededor de 200 son del *locus* HLA-B, haciendo de esta región la más polimórfica conocida del genoma humano^{61,62}.

Debido al alto polimorfismo, se creó la necesidad de realizar una nomenclatura sistemática, la cual se encuentra bajo el control y la responsabilidad del comité de nomenclatura para factores del sistema HLA de la OMS/WHO⁶²; en el cual cada alelo de HLA tiene un número único correspondiente a un máximo de cuatro grupos de dígitos separados por el signo de dos puntos (:); la longitud de la designación del alelo depende de la secuencia del alelo y de la de su familiar más cercano (Figura 13)⁶².

La mayoría de los alelos se encuentran presentes en todas las poblaciones, sin embargo, algunos alelos difieren en su frecuencia entre las diferentes poblaciones; de hecho, el alelo más común en una población raramente tiene una frecuencia mayor al 15 o 20%, por lo que no se puede afirmar la existencia de alelos muy comunes. Debido a la variabilidad del *loci* del HLA se ha facilitado la demostración la asociación de algunos alelos con más de 40 enfermedades⁶¹.

Recientemente se ha informado de la participación del *loci* de HLA en RAM cutáneas severas, algunos alelos de la clase I de HLA tales como HLA-B*15:02, HLA-B*58:01 y HLA-B*57:01 se han reportado como biomarcadores prometedores para discriminar pacientes con alto riesgo de reacciones de hipersensibilidad a medicamentos tales como carbamazepina, alopurinol o abacavir, respectivamente⁶³⁻⁶⁵.

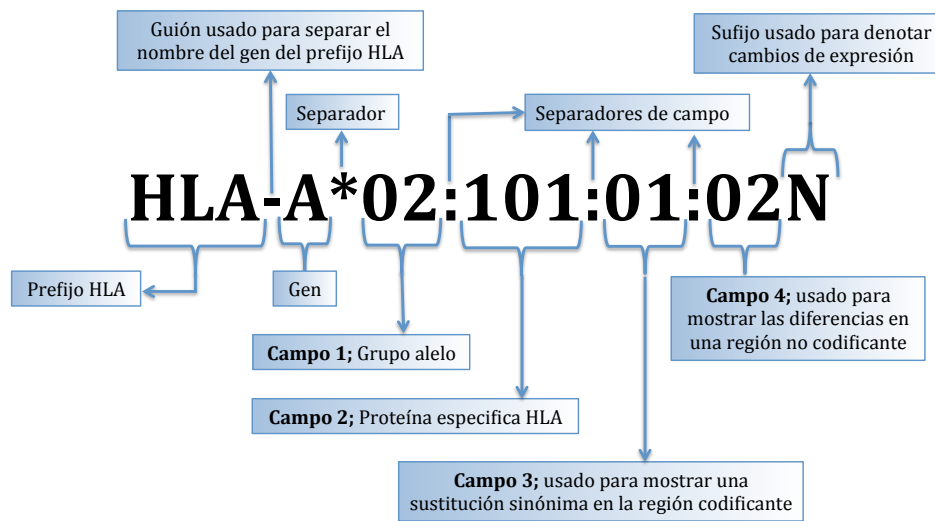


Figura 13. Nomenclatura de los alelos de los genes del sistema HLA.
Tomado de www.hla.allele.org⁶².

Con respecto a los alelos del *loci* HLA, Génin y cols. 2011, en un estudio de GWAS, estudiaron 424 pacientes con RAM cutáneas severas (SJS, SJS/NET, NET), que se atribuyeron causadas por la administración de alopurinol, carbamazepina o fenitoína y quienes se compararon con 1881 controles sanos y no relacionados. En el primer grupo se hallaron seis SNPs localizados en la región de los genes HLA⁶⁶. De estos SNPs, el más significativo estaba localizado a ~85 kb corriente arriba del locus del HLA-B, mientras que los otros cinco se localizaron hacia la región telomérica; lo que sugiere, que otras variantes genéticas dentro de la región de los genes HLA podrían explicar la susceptibilidad para el desarrollo de SJS/NET⁶⁶.

Chung y cols., en 2004, hallaron asociación entre el alelo HLA-B*15:02 y el SJS en pacientes que habían recibido carbamazepina; en total estudiaron 44 pacientes chinos Han de Asia oriental con SJS posterior a la administración de carbamazepina y observaron que todos los pacientes presentaban el alelo HLA-B*15:02⁴². En general la población Han, presenta una frecuencia alélica para HLA-B*15:02 de 8.6% que aunque no es muy alta si lo sería si se le compara con la población caucásica o japonesa^{5,63}.

Posteriormente, Man y cols. 2007, Lochareernkul y cols. 2008 y Mehta y cols. 2009, estudiaron tres poblaciones asiáticas (chinos Han de Hong Kong, población Thai e hindúes, respectivamente), informando que el alelo HLA-B*15:02 se asociaba con mayor frecuencia en pacientes con SJS o NET que era inducido por agentes anticonvulsivantes aromáticos como carbamazepina, fenitoína y lamotrigina⁶⁷⁻⁶⁹.

En contraste, en el 2006 Lonjou y cols. estudiaron 12 pacientes europeos con SJS o NET inducido por carbamazepina, encontrando el alelo HLA-B*15:02 en cuatro pacientes con ancestría asiática, mientras que este alelo no fue encontrado en los ocho pacientes restantes, lo que indica que el alelo HLA-B*15:02 tiene una frecuencia extremadamente baja en la población de Europa y que su expresión deletérea probablemente se restringe a poblaciones con ancestría derivada del sur de Asia^{11,64}.

Del mismo modo, Kaniwa y cols. 2008 estudiaron 58 pacientes japoneses con SJS o NET secundario a la administración de carbamazepina, sin encontrar el alelo HLA-B*15:02⁶³. Un poco antes, la misma observación se había dado por Alfirevic y cols. 2006 al estudiar 99 pacientes caucásicos con hipersensibilidad a carbamazepina; no obstante, encontraron en baja frecuencia el alelo HLA-B*07:02, para el cual postularon como relacionado con un efecto protector contra las RAM cutáneas severas a carbamazepina, pero aún se requiere de estudios de validación para clarificar este efecto¹².

La asociación de RAM cutáneas severas inducidas por el alopurinol y asignadas al alelo HLA-B*58:01 fue propuesta en pacientes chinos Han de Taiwán y confirmada en pacientes caucásicos^{70,71}; sin embargo, la asociación observada en los primeros fue extremadamente fuerte (100%) mientras que se observó una asociación moderada en los pacientes europeos (61%)^{63,70}. Estudios en población japonesa quienes presentaron SJS o NET posterior a la administración de alopurinol evidencian una frecuencia del alelo HLA-B*58:01 del 40.0%, frecuencia menor a la observada en los pacientes europeos; esto teniendo en cuenta que la frecuencia alélica del HLA-B*58:01 en la población japonesa sana (1.2%), que es comparable con la de la población europea (1.5%)⁶³.

Así mismo, en el 2002 se observó una fuerte asociación con el alelo HLA-B*57:01 y el síndrome de hipersensibilidad a medicamentos producido tras la administración de abacavir⁶⁴. El HLA-B*57:01, al igual que otros alelos de HLA, no está representado de igual forma entre todas las poblaciones, siendo más prevalente en población europea (5-8%) comparado con la población africana-americana (2.4%)^{64,65}.

Mallal y cols. 2002 genotipificaron 200 pacientes caucásicos expuestos a abacavir y encontraron que 18 desarrollaron hipersensibilidad al medicamento; de estos, 14 tenían el alelo HLA-B*57:01^{15,16}. Se demostró que era posible predecir a aquellos pacientes en los que era mas probable que se presentara hipersensibilidad a abacavir y sugirieron la utilidad clínica de la determinación de HLA-B*57:01 para prevenir las reacciones de hipersensibilidad secundarias a este medicamento^{16,64,65}.

Conociendo la importancia de estudiar los distintos mecanismos involucrados en el desarrollo de RAM cutáneas severas, cabe resaltar que estudios realizados recientemente sugieren la determinación de distintos alelos del subtipo HLA-B en pacientes con SJS ó NET de distintos orígenes étnicos, que puedan estar relacionados con el desarrollo del fenotipo, previo a una amplia aplicación en la practica clínica de los resultados hallados en otras poblaciones^{5,12,13,65}.

5. HIPÓTESIS

En la actualidad se conocen de manera parcial los mecanismos implicados en la etiopatología del SJS o NET asociado a medicamentos. Clínicamente se ha evidenciado que la administración de algunos medicamentos químicamente distintos, puede generar una respuesta inmune que converge hacia un fenotipo común y que diverge entre poblaciones.

Se estima que el origen de esta respuesta, se puede relacionar con variantes drásticas en uno o en algunos genes cruciales pertenecientes a vías moleculares del metabolismo de los medicamentos, o así mismo con genes involucrados en el inicio de la respuesta inmune tal y como es el caso del *Antígeno Leucocitario Humano (HLA)*.

Con esta premisa, al realizar el análisis molecular del gen *HLA-B* se espera responder la pregunta sobre si hay polimorfismos de riesgo en la población analizada en Colombia, que puedan estar o no asociados con el desarrollo del efecto adverso medicamentoso a nivel cutáneo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Tipo de Estudio

El estudio desarrollado es de tipo observacional y analítico de casos.

6.2. Universo y Muestra

El universo de muestra incluido dentro del estudio corresponde a pacientes, hombres y mujeres, colombianos de todas las edades, que hayan tenido una reacción adversa cutánea medicamentosa severa (SJS, SJS/NET, NET), identificados en las revisiones de historias clínicas realizadas por los médicos dermatólogos, oftalmólogos, internistas y pediatras de las diferentes instituciones participantes, teniendo en cuenta los criterios diagnósticos basados en la morfología clínica definida por Roujeau en 1994⁴³.

Cada paciente que aceptó voluntariamente a participar, firmó el consentimiento informado aprobado por el comité de Ética de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario, diseñado expresamente para el estudio.

Los pacientes incluidos en el estudio continuaron con el tratamiento previsto por los médicos tratantes, sin intervención alguna del equipo de investigadores. Es importante resaltar que, debido a la baja frecuencia de la enfermedad, se accedió a la mayor cantidad de individuos afectados que fue posible.

6.3 Métodos de laboratorio

Previo la firma del consentimiento informado, se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre venosa periférica de cada paciente incluido en el estudio en tubos con anticoagulante EDTA (ácido-etilen-di-amino-tetra-acético).

6.3.1 Estudio de ADN genómico

6.3.1.1 Extracción de ADN

Se procedió a realizar la extracción de ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica de acuerdo con el método de Miller (macrotécnica de *salting out*); en la cual inicialmente, se adicionó a la sangre total anticoagulada con EDTA, en un tubo Falcon, 5ml de solución de lisis para eritrocitos, seguidamente, se incubó la muestra en hielo por 20 minutos, se mezcló inicialmente de manera suave y luego se centrifugó durante 10 minutos a 5.000 rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de leucocitos en 3ml de solución de lisis para eritrocitos; se incubó nuevamente en hielo por 15 minutos y se repitió el paso de centrifugación; se descartó el sobrenadante y se lavó de nuevo la pastilla de leucocitos con solución de lisis para eritrocitos.

Seguidamente, se resuspendió el botón en 750 μ l de solución de lisis para células blancas; se adicionaron 50 μ l de SDS al 10%, 15 μ l de proteinasa K y se incubó la mezcla a 56°C por 3 horas. Se agregaron 500 μ l de NaCl saturado, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó por 18 minutos a 5.000 rpm. Inmediatamente se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se repitió la centrifugación por 7 minutos. Se transfirió de nuevo el sobrenadante a otro tubo y se precipitó el ADN con dos volúmenes de etanol al 100%.

Finalmente, se descartó el etanol, se dejaron evaporar los restos de este para luego adicionar 300 μ l de TE 1X; se mezcló durante 15 minutos y se almacenó en nevera a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Luego de la extracción y aislamiento del ADN, se verificó por espectrofotometría la calidad y cantidad del mismo ajustando cada muestra a una concentración final de 30 ng/ μ l; la cual fue usada para la genotipificación de los alelos de HLA-B.

6.3.1.2 Genotipificación Alelos HLA-B

La genotipificación de alta resolución del HLA-B se llevo a cabo por medio del kit de secuenciación SeCore® de Invitrogen™ de acuerdo al protocolo y las recomendaciones del fabricante; para lo cual se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Amplificación del ADN genómico específica de locus

El grupo del locus B contiene dos juegos de mezcla amplificadora (S1 y S2), para lo cual se prepararon dos reacciones de amplificación para cada muestra (marcadas con el código M1 a M19 siguiendo el orden de la codificación) con sus respectivos controles negativos o blancos; las condiciones utilizadas para cada muestra fueron:

Reactivo	Volumen
Mezcla de amplificación	19,8 μ l
Taq ADN-polimerasa FastStart™	0,2 μ l
ADN muestra (Agua estéril-blanco)	5 μ l
Volumen total	25 μl

El programa en el termociclador fue:

Paso	No. Ciclos	Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial	1	95°C	4 min.
Ciclo	35	95°C	20 seg.
		63°C	20 seg.
		72°C	40 seg.
Extensión final	1	72°C	5 min.
Mantenimiento	1	4°C	Infinita

- Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó un gel de agarosa al 1.5%, se añadieron 5 µl de producto de PCR por muestra. Los tamaños de las bandas esperadas para el producto de amplificación del locus del grupo B eran de ~1250 y ~720 pb. Dependiendo del tipo de muestra era posible que la banda del producto de 1250 pb estuviera o no presente en una o ambas amplificaciones. Para la secuenciación de los exones 2 y 3, se prepararon reacciones de secuencia para todas las amplificaciones que resultaron positivas para el producto de 1250 pb. El exón 4 (720 pb) es idéntico en las mezclas 1 y 2, por lo que solo se amplificó uno de los tubos para este exón (Figura 14).

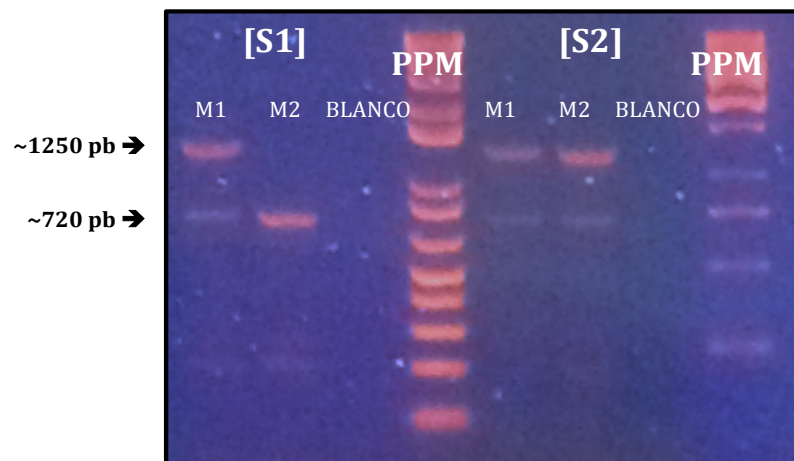


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa. [S1]= Mezcla 1; [S2]= Mezcla 2; M1= Paciente 1; M2= Paciente 2; PPM= Patrón de peso molecular.

- Purificación de los amplicones de PCR (ExoSAP-IT™)

Se trataron los amplicones de PCR con ExoSAP-IT™ con el fin de degradar los *primers* no incorporados e hidrolizar los dNTPs. Se añadieron 4 µl de ExoSAP-IT™ a los tubos de amplificación con productos positivos para la banda de ~1250 pb, se centrifugó brevemente y se agitó con vórtex, el programa de amplificación usado en el termociclador fue:

Paso	No. Ciclos	Temperatura	Duración
Ciclo	1	37°C	20 min.
		80°C	20 min.
Mantenimiento	1	4°C	Infinita

- Reacción de Secuenciación

El número de reacciones de secuenciación dependió del patrón de reacciones positivas, cuando las dos reacciones de amplificación fueron positivas para la banda de ~1250 pb se realizaron las reacciones de las secuencias *forward* y *reverse* para los exones 2 y 3 para ambos productos de la reacción; en cambio, solo se realizó la secuenciación de uno de los dos productos del exón 4 (~720 pb). En todos los casos, las mezclas de reacción de secuenciación se conservaron frías utilizando hielo.

Se extrajeron 2 µl de los productos de PCR tratados con ExoSAP-IT™ en un nuevo tubo y se añadió 8 µl de cada mezcla de secuenciación específica del locus, al tubo correspondiente, se agitó en vórtex brevemente y se centrifugó. El programa de amplificación para la reacción de secuenciación usado en el termociclador fue:

Paso	No. Ciclos	Temperatura	Duración
Ciclo	25	95°C	20 seg.
		50°C	15 seg.
		60°C	60 seg.
Mantenimiento	1	4°C	Infinito

- Precipitación con etanol de los productos de reacción de secuenciación

Después de la reacción de secuenciación, se realizó una precipitación con etanol con el fin de eliminar los terminadores sobrantes. Se añadieron 2 µl de tampón PPT de secuenciación a cada mezcla de reacción de secuenciación, se realizó un breve centrifugado para asegurar

que el contenido se mezcló correctamente y se depositó en el fondo del pocillo. Posteriormente, se añadieron 40 µl de etanol al 100% a cada mezcla, se agitó en vórtex por 60 segundos y se centrifugó durante 30 minutos a 2000 x G.

Seguidamente, se retiró la tapa y se dio vuelta a la placa sobre una toalla de papel para eliminar la mayor cantidad de líquido posible. Se añadieron 100 µl de etanol al 70% a los sedimentos de ADN, se centrifugó durante 5 minutos a 2000 x G y finalmente se eliminó el sobrenadante dando la vuelta a la placa nuevamente sobre una toalla de papel.

- Purificación con BigDye® XTerminator™

Se realizó una segunda purificación de las reacciones de secuenciación de ADN con el kit de BigDye®XTerminator™ con el fin de eliminar las sales y los terminadores aun no eliminados. Se adicionó a cada pozo 45 µl de solución SAM y 10 µl de la solución del kit, se agitó con un vórtex por 30 minutos, seguidamente se centrifugó por 2 minutos a 1.000 x G y se ubicó la placa en el inyector automático del secuenciador para dar inicio a la corrida.

- Electroforesis en el analizador genético de electroforesis capilar

Para dar inicio al corrido del secuenciador se usaron las siguientes condiciones:

Parámetros	Valores
Dye Set	E
Mobility File	KB_3100_POP6_BDTv1.mob
Base caller	Kb. bcp
Run Module	RapidSeq36_POP6
Injection Time	10 seconds
Default Run Time	1800 seconds

6.3.1.3 Análisis de datos

Para el análisis de los resultados se utilizó el software *sequencing analysis* con el fin de procesar los datos recopilados y crear los archivos de secuencia. Finalmente, se utilizó el software uTYPE® SBT para procesar los archivos de secuencia y crear el informe de tipaje de HLA-B.

7. ASPECTOS ETICOS

De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio se clasifica como una “INVESTIGACIÓN CON RIESGO MÍNIMO”, artículo 11, numeral B. Los riesgos para el paciente son derivados únicamente de la toma de una muestra de sangre, los cuales se consideran mínimos para el paciente.

Se presentó a cada paciente y en el caso de los menores de edad a sus tutores legales, información amplia sobre el proyecto, donde se incluyeron los objetivos, personas participantes, manejo de las muestras, riesgos, estrategia de comunicación de los resultados y hallazgos. Se hizo énfasis en la libre participación, sin costo, bajo protección de ser anónima y el derecho de ser excluidos de recibir información sobre los resultados, productos de la investigación o retirarse en cualquier momento.

Posteriormente, se siguió a entregar el documento de consentimiento informado a cada participante para ser firmado; en este se presentaron los datos personales, incluyendo los de localización por distintos medios, de cada uno de los investigadores, la información suministrada a los pacientes o a los tutores legales en el caso de los menores de edad. Así mismo, se mantuvieron registros de información personal y localización del paciente durante todo el tiempo de la investigación.

Los beneficios son directos para cada paciente, puesto que se identifican variaciones genéticas en el sistema HLA-B que pueden estar relacionados con los efectos adversos cutáneos severos luego de la administración de diferentes tipos de medicamentos. Las limitaciones son inherentes a que existan otras causas distintas a las involucradas en el presente estudio, que sean responsables del efecto adverso que se investiga.

Se declara que los procedimientos y actividades a desarrollar en el presente proyecto se adhirieron a las normas del Comité de Ética de la Universidad del Rosario, así como a la Declaración de Helsinki en su última versión. Los investigadores declararon no tener conflictos de interés.

8. RESULTADOS

8.1 Correlación clínica y características demográficas de los pacientes

Se estudiaron un total de 19 pacientes afectados por SJS, NET o SJS/NET (nombrados *M1 a M19*) (Tabla 4). Doce pacientes fueron clasificados como NET, cinco como SJS y dos como SJS/NET, basados en la clasificación clínica propuesta por Harr y colaboradores⁸; dos de los 19 pacientes pertenecían a la misma familia (*M18*, madre; *M19*, hijo), los cuales al momento del análisis se contaron como un solo genotipo para evitar sesgos de muestreo (Tabla 4).

La edad promedio fue de 32 años (rango, 1 a 68 años), diez fueron mujeres y eran naturales de 7 departamentos en Colombia. La mayor representación se observó para el departamento de Cundinamarca con un 57.8% de los casos (11 de 19 pacientes, de los cuales 8 pacientes son naturales de la capital, Bogotá D.C); seguido por departamentos como Tolima y Valle del Cauca con un 10.5% de los casos cada uno (2 de 19 pacientes) y finalmente Caldas, Cesar, Meta y Nariño con un 5.2% de los casos cada uno (1 de 19 pacientes) (Tabla 4).

Más de la mitad de los fenotipos se asociaron con la administración de anticonvulsivantes y antibióticos, segregados en un 36 y 26% respectivamente; estos hallazgos se encuentran en concordancia con resultados previos en donde se describen estos grupos de medicamentos como los más frecuentemente relacionados con SJS y NET^{72,73}.

Doce diferentes medicamentos se identificaron como relacionados con el inicio de los síntomas: carbamazepina (3 casos), lamotrigina (3 casos), medio de contraste (2 casos), sulfadoxina/pirimetamina (2 casos madre-hijo, *M18* y *M19*); la mezcla de acetaminofén/codeína (1 caso), cefalexina (1 caso), sulfonamida (1 caso), fenitoína (1 caso), nitrofurazona (1 caso), trimetoprim/sulfametoxazole (1 caso), metoclopramida (1 caso) y el compuesto de origen natural *Urtica dioica* (1 caso). No se pudo establecer asociación con un medicamento en particular para el caso *M3* (Tabla 4).

Aunque las RAM cutáneas raramente se han visto relacionadas con la administración de medio de contraste, en el presente estudio dos pacientes (*M5* y *M10*) fueron identificados al presentar RAM cutánea severa (fenotipo SJS) tras la administración este compuesto^{74,75} (Tabla 4).

ID	Edad	Género	Medicamento	Natural	Síntomas			%SCT	Fenotipo
					Manifestaciones sistémicas	Compromiso de mucosas	Exantema/Flictenas		
M1	29	F	Acetaminofén/Codeína	Aldana (Nariño)	Ninguno	Oral	S/N	10	SJS
M2	59	M	<i>Urtica dioica</i>	Bogotá, D.C	Fiebre	Oral, ocular	S/N	20	SJS/NET
M3	59	F	Desconocido	Valledupar (Cesar)	Fiebre	Oral, ocular	S/S	95	NET
M4	46	F	Lamotrigina	Cali (Valle del Cauca)	Fiebre, leucocitosis	Oral, genital	S/S	70	NET
M5	48	F	Medio de Contraste	Bogotá, D.C	Ninguno	Oral, genital	S/N	10	SJS
M6	68	F	Carbamazepina	Ibagué (Tolima)	Fiebre	Oral, ocular, genital	S/S	80	NET
M7	15	F	Lamotrigina	Bogotá, D.C	Fiebre, leucocitosis	Oral, ocular, genital	S/S	80	NET
M8	37	M	Cefalexina	Bogotá, D.C	Fiebre, leucocitosis, CFR, CFH	Oral, ocular, genital	S/S	90	NET
M9	30	M	Sulfonamida	Bogotá, D.C	Ninguno	Oral	S/N	10	SJS
M10	35	M	Medio de Contraste	Villeta (Cundinamarca)	Artralgias	Oral	S/S	10	SJS
M11	45	F	Fenitoína	Dorada (Caldas)	Fiebre, leucocitosis	Oral, ocular	S/S	60	NET
M12	36	F	Nitrofurazona	Puerto Lleras (Meta)	Leucocitosis	Ocular	S/N	20	SJS/NET
M13	5	M	Carbamazepina	Girardot (Cundinamarca)	Fiebre, leucocitosis	Oral, ocular	S/S	80	NET
M14	18	M	Carbamazepina	Bogotá, D.C	Fiebre, leucocitosis, CFH	Oral, ocular, genital	S/S	80	NET
M15	54	F	Trimetoprim-Sulfametoxazole	Cali (Valle del Cauca)	Artralgias, leucocitosis	Oral	S/S	78	NET
M16	9	M	Metoclopramida	Cáqueza (Cundinamarca)	Fiebre	Oral, genital	S/N	80	NET
M17	5	M	Lamotrigina	Bogotá, D.C	Fiebre, leucocitosis, CFH	Oral, ocular, genital	S/S	80	NET
M18	18	F	Sulfadoxina-Pirimetamina	Guamo (Tolima)	Fiebre, artralgias	Oral, ocular	S/S	80	NET
M19	1	M	Sulfadoxina-Pirimetamina	Bogotá, D.C	Ninguno	Ocular	S/N	10	SJS

Tabla 4. Características clínicas y demográficas de pacientes colombianos con RAM cutáneas severas. Se describen las características fenotípicas y demográficas de los 19 pacientes afectados, el medicamento responsable de la reacción, su lugar de nacimiento, sus síntomas y su fenotipo. S= Si; N= No; CFR= Compromiso de la función renal; CFH= Compromiso de la función hepática % SCT = Porcentaje de superficie corporal afectada.

8.2 Electroforesis en Gel de Agarosa del ADN genómico específico del locus B amplificado

El análisis de alelos para el gen B del HLA se realizó a partir de la amplificación del *locus* hasta que se obtuvieron las bandas esperadas de ~1250 y ~720 pb. El fragmento de ~720 pb corresponde a la amplificación del exón 4 del gen HLA-B (región no variable), mientras que el fragmento de ~1250 corresponde a los exones 2 y 3 del gen HLA-B (región variable).

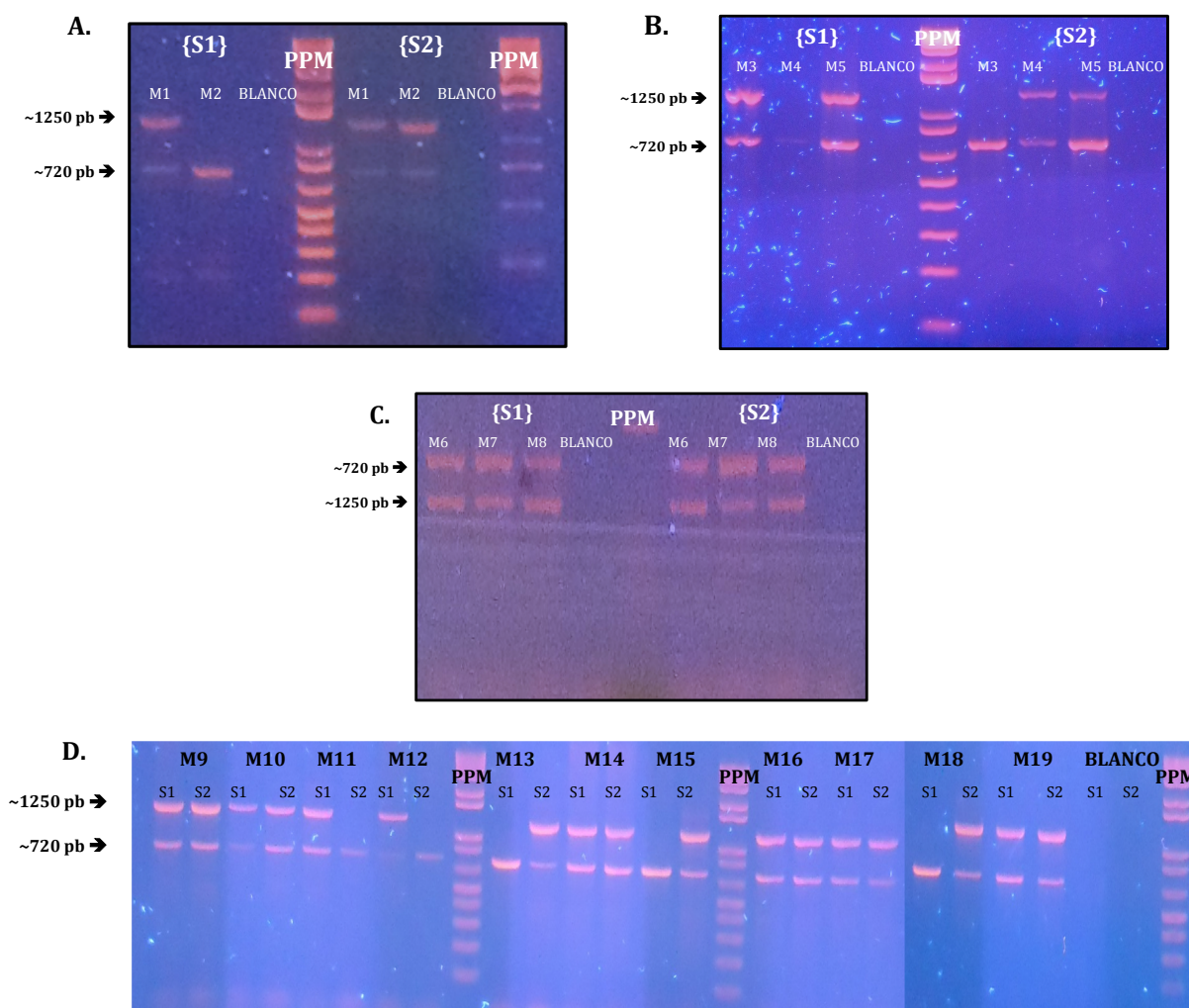


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa en los pacientes 1 a 19. A, B y C muestran las electroforesis correspondientes a los pacientes 1 al 8 agrupados por cada una de las mezclas. D. Muestra la electroforesis de los pacientes 9 a 19 para cada una de las mezclas. S1 = Mezcla 1; S2 = Mezcla 2; M1-M19 = Paciente 1- Paciente19;PPM = Patrón de peso molecular.

Por pertenecer el exón 4 a la región no variable del gen HLA-B, este se utilizó como control interno de amplificación, por ello se colocó una sola vez en cada muestra para verificar la fidelidad de la secuencia del fragmento (Figura 14).

El análisis de la región variable (exones 2 y 3) en cada muestra requirió de dos amplicones por cada persona afectada por SJS, NET o SJS/NET (nombrados M1 a M19), los cuales se observan como S1 (Mezcla 1) y S2 (Mezcla 2) (Figura 13 A, B, C y D).

8.3 Asignación de alelos del locus HLA-B

La asignación de los alelos del locus HLA-B se realizó mediante el programa computacional uTYPE® SBT el cual analiza imágenes de los fragmentos de ADN amplificados y secuenciados para la asignación de los alelos. Los resultados se obtienen mediante la comparación con la base de datos IMGT/HLA del Instituto Europeo de Bioinformática (Figura 16).

El programa uTYPE® combina el análisis rápido de los datos con el manejo efectivo de los resultados; utilizando una función de filtro único que no modifica el archivo de datos original (*raw data*), eliminando las combinaciones de alelos no coincidentes en consideración, mientras que los informes personalizados que contienen resultados interpretados se encuentran siempre disponibles para su revisión.

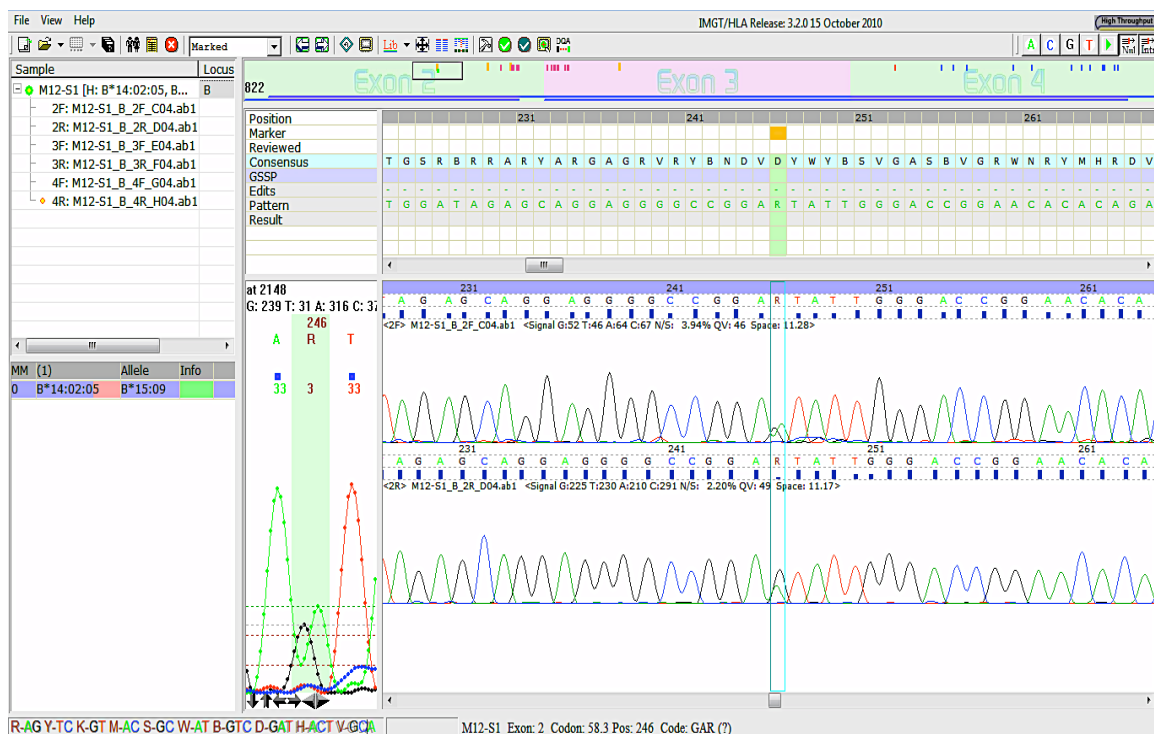


Figura 16. Ejemplo de asignación de alelos de HLA-B por medio de uType®. Caso 12 (M12).

En el presente análisis se estudiaron un total de 19 pacientes afectados por SJS, NET o SJS/NET (nombrados *M1* a *M19*) de los cuales como se había mencionado anteriormente, al momento del análisis se contaron los pacientes pertenecientes a la misma familia (*M18*, madre y *M19*, hijo) como un solo genotipo para evitar sesgos de muestreo. Se identificaron 27 alelos diferentes para el locus HLA-B (Tabla 5).

ID	Fenotipo	Genotipo
M1	SJS	B*39:09/B*40:02
M2	SJS/NET	B*44:03/B*44:03
M3	NET	B*15:04/B*15:10
M4	NET	B*27:05/B*35:01
M5	SJS	B*15:01/B*51:01
M6	NET	B*41:05/B*44:03
M7	NET	B*39:05/B*18:01
M8	NET	B*45:01/B*44:02
M9	SJS	B*39:06/B*35:35
M10	SJS	B*08:01/B*40:02
M11	NET	B*07:02/B*48:02
M12	SJS/NET	B*14:02/B*15:09
M13	NET	B*35:43/B*53:01
M14	NET	B*07:02/B*35:49
M15	NET	B*18:07/B*35:01
M16	NET	B*07:02/B*44:03
M17	NET	B*38:01/B*15:20
M18	NET	B*40:02/B*44:03
M19	SJS	B*14:01/B*44:03

Tabla 5. Genotipificación de pacientes colombianos afectados por RAM cutáneas severas. Se muestran los 19 pacientes con sus respectivos fenotipos para las RAM cutáneas severas así como los genotipos para el *locus* HLA-B.

8.4 Análisis Bioinformáticos

El análisis de la información a partir de la genotipificación del *locus* HLA-B se obtuvo a través de los programas *GENEPOP* versión 4.1.4^{76,77} y *ARLEQUIN* versión 1.0⁷⁸.

8.4.1 Frecuencias Alélicas

Se realizó el análisis de las frecuencias de los 27 alelos hallados en el estudio y la posible asociación con cada uno de los medicamentos o sustancias a las que fueron expuestos los pacientes. Se estimó el coeficiente de endogamia (*Fis*), que mide los apareamientos no aleatorios dentro de una población, según Weir & Cockerham (1984), para cada alelo y para la población en general (Tabla 6). Este coeficiente otorga puntuaciones que van desde 0 a 1, siendo 1 el máximo de endogamia.

Los alelos más frecuentes observados fueron B*44:03 (13.8%), B*07:02 (8.3%), B*40:02 (8.3%) y B*35:01 (5.5%)(Tabla 5); así mismo, se observó una frecuencia más alta de lo esperado para el alelo HLA-B*44:03 (5.5%) asociado con el cuadro clínico mixto de SJS/NET, en una persona quien recibió el compuesto natural *Urtica dioica* (Tabla 7).

HLA-B	Frecuencia	Fis (W&C)
B*07:02	0.0833	-0.0625
B*08:01	0.0278	0.0000
B*14:02	0.0278	0.0000
B*15:01	0.0278	0.0000
B*15:04	0.0278	0.0000
B*15:09	0.0278	0.0000
B*15:10	0.0278	0.0000
B*15:20	0.0278	0.0000
B*18:01	0.0278	0.0000
B*18:07	0.0278	0.0000
B*27:05	0.0278	0.0000
B*35:01	0.0556	-0.0303
B*35:35	0.0278	0.0000
B*35:43	0.0278	0.0000
B*35:49	0.0278	0.0000
B*38:01	0.0278	0.0000
B*39:05	0.0278	0.0000
B*39:06	0.0278	0.0000
B*39:09	0.0278	0.0000
B*40:02	0.0833	-0.0625
B*41:05	0.0278	0.0000
B*44:02	0.0278	0.0000
B*44:03	0.1389	0.3289
B*45:01	0.0278	0.0000
B*48:02	0.0278	0.0000
B*51:01	0.0278	0.0000
B*53:01	0.0278	0.0000
Total	1	0.0302

Tabla 6. Frecuencias alélicas HLA-B. Se muestran los 27 alelos encontrados en la población analizada, con las frecuencias alélicas y los valores de Fis (coeficiente de endogamia) según Weir & Cockerham (1984). Se resaltan los alelos más frecuentes.

HLA-B	MEDICAMENTO												
	A/C	UD	DC	LTG	MC	CBZ	CEX	SLF	PHT	NFZ	TMP/SMX	MTC	S/P
B*07:02	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0,0278	0	0	0,0278	0
B*08:01	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0
B*14:02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0
B*15:01	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0
B*15:04	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B*15:09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0
B*15:10	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B*15:20	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B*18:01	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B*18:07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0
B*27:05	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B*35:01	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0
B*35:35	0	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0
B*35:43	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0
B*35:49	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0
B*38:01	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B*39:05	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B*39:06	0	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0
B*39:09	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B*40:02	0,0278	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0,0278
B*41:05	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0
B*44:02	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0
B*44:03	0	0,0556	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0,0278	0,0278
B*45:01	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0
B*48:02	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0
B*51:01	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0	0
B*53:01	0	0	0	0	0	0,0278	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 7. Comparación de las frecuencias alélicas y la asociación con los medicamentos o sustancias suministradas a los pacientes con SJS, NET y SJS/NET. Se muestran los 27 alelos identificados para HLA-B en la población analizada y los medicamentos asociados. A/C= Acetaminofén/Codeína; UD = *Urtica dioica*; DC = Desconocido; LTG = Lamotrigina; MC = Medio de Contraste; CBZ = Carbamazepina; CEX = Cefalexina; SLF = Sulfonamida; PHT = Fenitoína; NFZ = Nitrofurazona; TMP/SMX = Trimetoprim/Sulfametoxazole; MTC = Metoclopramida; S/P = Sulfadoxina/Primetamina.

8.4.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

El cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg evalúa la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas en un *locus* autosómico, diploide, que se presume se halla en equilibrio. El desequilibrio de Hardy-Weinberg ocurre cuando hay migración, selección, mutación, endogamia o deriva genética, en una población⁷⁹. El test de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) se realizó para toda la población en estudio, teniendo en cuenta la hipótesis nula H_0 = no hay asociación entre los alelos del *locus* HLA-B en la población colombiana y el fenotipo (SJS, NET o SJS/NET) y la hipótesis alternativa H_i = hay asociación entre los alelos del *locus* HLA-B en la población colombiana y el fenotipo (SJS, NET o SJS/NET), según los métodos descritos por Weir & Cockerham (1984) y Robertson & Hill (1984), considerando que valores menores de 0.05 rechazan la hipótesis nula (H_0) y valores por encima de este la aceptan.

Se evaluó la significancia estadística por medio de un algoritmo de cadenas de Markov para estimar el valor exacto de p sin sesgos por el tamaño muestral, teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

```
Estimation of exact P-values by the Markov chain method.
-----
Markov chain parameters for all tests:
Dememorization:      10000
Batches:              20
Iterations per batch: 5000
Hardy weinberg: Probability test
*****
```

Se obtuvo un valor de p 0.6141, que apoya la hipótesis nula, esto es, que no hay asociación entre los alelos (genotipo) y el fenotipo (SJS, NET o SJS/NET), con un valor de F_{is} (W&C) de 0.0302, que indica que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (Figura 17).

Results by population					

Pop : M18					

Fis estimates					

Locus	P-val	S.E.	W&C	R&H	Steps

HLAB	0.6141	0.0875	0.0302	0.0057	213 switches (low!)
Normal					

Figura 17. Resultados test de Hardy-Weinberg por población. Se muestran los resultados del test de Hardy-Weinberg para la población estudiada. p-val= valor de p ; S.E= error estándar; Fis= estimación de endogamia.

8.4.3 Análisis molecular de varianza (AMOVA)

El AMOVA es un método de estimación de la diferenciación poblacional a partir de datos moleculares y pruebas de hipótesis sobre esa diferenciación⁸¹. El análisis se realizó comparando las frecuencias alélicas encontradas en el presente estudio (n=18) con las frecuencias de estos mismos alelos presentes en poblaciones de América y en otras poblaciones de Colombia, con el fin de identificar posibles diferencias o similitudes entre las diferentes poblaciones. Para tal fin se usaron los siguientes ajustes:

```
=====
Settings used for Calculations
=====

</title> <data>

General settings:
-----
      Deletion weight           = 1
      Transition weight weight  = 1
      Tranversion weight weight = 1
      Epsilon Value             = 1e-07
      Significant digits for output = 5
      Use original haplotype definition
      Allowed level of missing data = 0.05

Active Tasks:
-----

Analysis of Molecular Variance:
-----
      No. of Permutations = 1000

Population pairwise Fst values:
-----
      Compute pairwise differences
      Compute coancestry coefficients
      Compute Slatkin's distances
      No. of permutations for significance = 100
      No. of permutations for Mantel test = 1000

Distance matrix:
      Compute F-statistics on haplotype frequencies only

Exact test of population differentiation:
-----
      No. of steps in Markov chain      = 100000
      No. of Dememorisation Steps      = 10000
      Required precision on Probability = 0
      Print Histogram and table : Yes
      Significance level                 = 0.05
```

8.4.4.1 Análisis AMOVA en poblaciones de América

Para los análisis de AMOVA en los diferentes grupos poblacionales de América se tuvieron en cuenta las siguientes frecuencias alélicas (Tabla 8)^{82,83}.

HLA-B	Colombia SJS o NET (n = 18)	Argentina (n = 86)	Brasil (n = 95)	Chile (n = 70)	Cuba (n = 70)	México (n = 234)	U.S* (n = 265)	U.S** (n = 234)	U.S*** (n=251)
B*07:02	0.0833	0.0120	0.0630	0.0619	0.0790	0.0406	0.1113	0.0620	0.0817
B*08:01	0.0278	0.0170	0.0740	0.0202	0.0570	0.0064	0.1094	0.0385	0.0458
B*14:02	0.0278	-	0.0530	0.0356	0.0570	0.0321	0.0340	0.0406	0.0179
B*15:01	0.0278	0.0230	0.0110	0.0100	0.0210	0.0214	0.0604	0.0278	0.0100
B*15:04	0.0278	0.0640	0.0000	-	0.0000	-	-	-	-
B*15:09	0.0278	-	0.0000	-	0.0000	-	-	-	-
B*15:10	0.0278	-	0.0160	-	0.0000	0.0021	0.0057	0.0043	0.0239
B*15:20	0.0278	0.0060	0.0000	-	0.0000	-	-	-	-
B*18:01	0.0278	-	0.0630	0.0356	0.0640	0.0171	0.0283	0.0491	0.0319
B*18:07	0.0278	-	0.0000	-	0.0000	-	-	-	-
B*27:05	0.0278	-	0.0160	0.0151	0.0140	0.0064	0.0226	0.0256	0.0120
B*35:01	0.0556	0.0640	0.0420	0.0151	0.0290	0.0577	0.0679	0.0705	0.0637
B*35:35	0.0278	-	-	-	-	-	-	-	-
B*35:43	0.0278	-	0.0000	-	0.0000	0.0192	-	-	-
B*35:49	0.0278	-	-	-	-	-	-	-	-
B*38:01	0.0278	0.0060	0.0320	0.0151	0.0430	0.0128	0.0245	0.0171	0.0040
B*39:05	0.0278	0.0230	0.0000	-	0.0140	0.0791	-	0.0214	-
B*39:06	0.0278	-	0.0160	-	0.0140	0.0684	0.0075	0.0171	0.0040
B*39:09	0.0278	0.0120	0.0000	0.0513	0.0000	-	-	-	-
B*40:02	0.0833	0.1100	0.0160	0.0408	0.0000	0.0534	0.0151	0.0513	0.0020
B*41:05	0.0278	-	-	-	-	-	-	-	-
B*44:02	0.0278	-	0.0420	0.0304	0.0500	0.0107	0.1170	0.0342	0.0199
B*44:03	0.1389	0.0410	0.0530	0.0356	0.0640	0.0278	0.0302	0.0556	0.0339
B*45:01	0.0278	-	0.0260	0.0100	0.0210	0.0150	0.0038	-	0.0538
B*48:02	0.0278	0.0060	0.0000	-	0.0000	-	-	-	-
B*51:01	0.0278	0.0990	0.0840	0.0356	0.0640	0.0598	0.0566	0.0620	0.0120
B*53:01	0.0278	-	0.0160	0.0100	0.0210	0.0128	0.0038	0.0299	0.1056

Tabla 8. Frecuencias Alélicas locus HLA-B en diferentes grupos poblacionales de América. Frecuencias alélicas para HLA-B hallados para población colombiana comparados con otros grupos poblacionales en América. U.S*= Caucásicos; U.S**= Hispánicos; U.S***= Afro-Americanos^{82,83}.

Y se usaron las siguientes etiquetas con el objetivo de marcar la poblaciones para el análisis:

List of labels for population samples used below:

```

Label      Population name
-----
1:         Colombia Estudio
2:         Argentina
3:         Brasil
4:         Chile
5:         Cuba
6:         Mexico
7:         U.S*
8:         U.S**
9:         U.S***
</pairDistPopLabels> <data>

```

El análisis de comparación pareada entre poblaciones estimó unos valores de *Fst* que permiten identificar la similitud entre las distintas poblaciones analizadas con la población estudiada de Colombia cuando se encuentran valores cercanos a 0. La similitud fue mayor con las poblaciones de Chile, Cuba, México y la población de “hispanos” estadounidenses (U.S hispanos). Esto a pesar de tener valores negativos en los casos de las poblaciones de Chile, Cuba e “hispanos” de los Estados Unidos, lo que sería explicado por la presencia de tamaños muestrales desiguales. La mayor similitud se obtuvo en la comparación de la

presente muestra con la de la población de “hispanos” en los Estados Unidos de América ($F_{st} = -0.00093$) (Tabla 9).

Grupos étnicos América	Estudio Colombia	Valor de p
1. <i>Estudio Colombia</i>	0.00000	*
2. <i>Argentina</i>	0.02291	0.00901+-0.0091
3. <i>Brasil</i>	-0.01104	0.85586+-0.0366
4. <i>Chile</i>	-0.00966	0.82883+-0.0265
5. <i>Cuba</i>	-0.00385	0.63964+-0.0287
6. <i>México</i>	0.00816	0.15315+-0.0273
7. <i>U.S*</i>	0.02204	0.02703+-0.0139
8. <i>U.S**</i>	-0.00093	0.50450+-0.0562
9. <i>U.S***</i>	0.02033	0.02703+-0.0194

Tabla 9. Comparación pareada entre poblaciones de América. Se muestran los valores de F_{st} comparando cada uno de los distintos grupos poblacionales de América con la población estudiada de Colombia con sus respectivos valores de p . Nivel de significancia = 0.0500. U.S*= Caucásicos; U.S**= Hispánicos; U.S***= Afro-Americanos^{82,83}.

8.4.4.2 Análisis AMOVA en poblaciones de Colombia

Para los análisis de AMOVA en las diferentes poblaciones colombianas se tuvieron en cuenta las siguientes frecuencias alélicas (Tabla 10)⁸⁴⁻⁹¹.

HLA-B	Pacientes SJS o NET (n=18)	Diferentes Regiones* (n=561)	Población Colombiana** (n=981)	Huila (n=200)	Suroccidente (n=1230)	Medellín (n=926)	Cali (n=59)	Afro-Colombianos Punta Soldado (n=74)	Afro-Colombianos San Basilio de Palenque (n=42)	Amerindios Colombianos Wayu (n=48)
B*07	0.0833	0.086	0.0663	0.0584	0.054	0.048	0.055	0.030	0.150	0.021
B*08	0.0278	0.022	0.0280	0.0357	0.028	0.030	0.014	0.022	0.125	-
B*14	0.0278	0.062	-	0.0682	0.054	0.003	0.042	0.007	0.124	-
B*15	0.1389	0.033	-	0.0617	0.062	0.006	0.098	0.171	0.200	0.260
B*18	0.0556	0.033	0.0729	0.0325	0.052	0.071	0.000	0.022	-	-
B*27	0.0278	0.022	0.0199	0.0455	0.015	0.014	0.000	0.007	-	0.010
B*35	0.1389	0.227	0.1927	0.1558	0.177	0.178	0.083	0.074	0.175	0.184
B*38	0.0278	0.032	0.0341	0.0292	0.022	0.024	0.028	0.000	-	-
B*39	0.0833	0.050	0.0561	0.0390	0.057	0.049	0.083	0.044	0.075	0.173
B*40	0.0833	0.077	-	0.0779	0.105	0.011	0.139	0.044	-	0.760
B*41	0.0278	0.006	0.0138	0.0357	0.016	0.014	0.014	0.007	-	-
B*44	0.1667	0.111	0.0770	0.1039	0.095	0.091	0.070	0.097	0.050	0.010
B*45	0.0278	0.014	0.0112	0.0130	0.015	0.011	0.083	0.044	-	-
B*48	0.0278	0.025	0.0224	0.0357	0.014	0.006	0.055	0.060	-	-
B*51	0.0278	0.080	0.1315	0.0779	0.068	0.064	0.125	0.015	0.087	0.173
B*53	0.0278	0.003	0.0127	0.0130	0.028	0.021	0.014	0.150	0.050	0.021

Tabla 10. Frecuencias Alélicas locus HLA-B en diferentes poblaciones colombianas. Frecuencias alélicas para HLA-B hallados para población colombiana de pacientes SJS o NET comparados con otras poblaciones colombianas⁸⁴⁻⁹¹. Diferentes Regiones*= Tomado de estudio de Arias-Murillo, 2010. Población Colombiana**= Tomado de estudio de Ossa, 2007.

Y se usaron las siguientes etiquetas con el objetivo de marcar la poblaciones para el análisis:

List of labels for population samples used below:

```
-----
Label      Population name
-----
1:         Colombia Estudio
2:         Diferentes regiones
3:         poblacion colombiana
4:         Huila
5:         Suroccidente
6:         Medellin
7:         Cali
8:         Afrocolombiana*
9:         Afrocolombiana**
10:        Amerindiocolombiana**
</pairDistPopLabels> <data>
```

El análisis de comparación pareada entre poblaciones estimo los valores de *Fst* identificando la gran similitud entre la población estudiada en el presente trabajo de pacientes colombianos con SJS o NET con las distintas poblaciones colombianas; sin embargo, se encontró mayor similitud con las poblaciones de Medellín y las Afrocolombianos de *San Basilio de Palenque*. El valor más alto de similitud se encontró con las poblaciones estudiadas por Arias-Murillo (*Fst*= -0.00291), que incluyó a personas de Bogotá, Cali, Barranquilla, Medellín, Villavicencio, Armenia, Bucaramanga y Neiva⁸⁴ (Tabla 11).

Poblaciones Colombianas	Estudio Colombia SJS o NET	Valor de <i>p</i>
1. <i>Estudio Colombia SJS o NET</i>	0.00000	*
2. <i>Diferentes regiones</i>	-0.00291	0.49550+-0.0610
3. <i>Población colombiana</i>	0.01433	0.11712+-0.0194
4. <i>Huila</i>	-0.01832	0.98198+-0.0096
5. <i>Suroccidente</i>	-0.01120	0.95495+-0.0151
6. <i>Medellín</i>	0.00578	0.27027+-0.0235
7. <i>Cali</i>	-0.01301	0.83784+-0.0334
8. <i>Afrocolombiana*</i>	-0.01147	0.74775+-0.0408
9. <i>Afrocolombiana**</i>	-0.00752	0.63063+-0.0591
10. <i>Amerindio colombiana**</i>	0.10932	0.00000+-0.0000

Tabla 11. Comparación pareada entre poblaciones colombianas. Se muestran los valores de *Fst* comparando cada una de las poblaciones colombianas con la población estudiada de Colombia pacientes con SJS o NET con sus respectivos valores de *p*. Nivel de significancia= 0.0500. *Diferentes Regiones**= Tomado de estudio de Arias-Murillo, 2010. *Población Colombiana***= Tomado de estudio de Ossa, 2007.

9. DISCUSIÓN

Desde la descripción original del SJS por parte de los médicos Stevens y Johnson en 1922 y luego de la NET por Alan Lyell en 1956⁴¹, durante décadas ha existido gran interés para identificar la causa, la fisiopatología y establecer un manejo adecuado de estas enfermedades que son frecuentemente severas y, a veces, mortales.

En cuanto a la etiología de estas patologías, hoy en día se conoce que ésta se desencadena principalmente por la ingesta de algún tipo de medicamento o por el contacto a sustancias que ocasionan una reacción aumentada que se presenta entre 1 a 3 semanas después de la administración del compuesto o la exposición a la sustancia⁹². Dado el solapamiento relativo de los fenotipos de SJS y NET, y la existencia incluso de un fenotipo intermedio, hoy en día se clasifican como pertenecientes a un mismo espectro, al cual se les denomina RAM cutáneas severas^{10,38,40,41,43}.

Las RAM se dividieron inicialmente en dos grandes grupos (*A* y *B*)¹⁴, el presente trabajo está centrado solamente en el estudio de las RAM del *tipo B*, fundamentalmente en las alergias a medicamentos cutáneas severas (SJS, el fenotipo intermedio SJS/NET y NET).

Las RAM del *tipo A* (85-90%), son aquellas respuestas tanto normales como aumentadas, pero no deseadas a cualquier fármaco, normalmente son dependientes de la dosis y predecibles. Comprenden las respuestas terapéuticas desmesuradas en el lugar de acción (por ejemplo, la hipoglicemia debida a una sulfonilurea), el efecto farmacológico deseado pero en otro lugar (por ejemplo, la cefalea debida a nitroglicerina) y los efectos farmacológicos secundarios (por ejemplo, la hipotensión ortostática debida a fenotiazinas)¹⁴. Por otra parte, las RAM del *tipo B* (5-10%), no guardan relación directa con las acciones farmacológicas conocidas de los fármacos en cuestión, se deben habitualmente a mecanismos inmunológicos o farmacogenéticos y pueden o no tener relación con la dosis administrada¹⁴.

A su vez, las RAM del *tipo B* se clasifican en reacciones de *hipersensibilidad* con un mecanismo inmunológico involucrado o sin este mecanismo comprobado; dentro de este sub-grupo se hallan las RAM cutáneas severas objeto del presente estudio (SJS, SJS/NET y NET), se encuentran en el grupo de las reacciones de hipersensibilidad que son mediadas por un mecanismo inmunológico, que para el caso de estas, son las células T²⁰.

Actualmente, se conocen más de 220 medicamentos implicados en el desarrollo del SJS, SJS/NET y NET; de estos, solo unos pocos son los más comúnmente involucrados: Antibióticos como sulfonamidas (particularmente trimetoprim/sulfametoxazol), β -lactámicos, tetraciclinas y quinolonas (especialmente ciprofloxacino). Anticonvulsivantes como fenitoína, fenobarbital, carbamazepina y lamotrigina. AINES particularmente los

pertenecientes al grupo de los oxicams y otros medicamentos como nevirapina, abacavir o allupurinol^{6,41,73}.

Seguidamente al hallazgo de la presencia de SJS, SJS/NET y NET, asociadas a la administración de fármacos, los estudios han tratado de identificar los factores causales que expliquen la relación entre la administración de diferentes tipos de medicamentos y las manifestaciones clínicas de las RAM cutáneas severas. Se ha observado que al administrar el fármaco, los pacientes en los que se desarrollaba la reacción (SJS, SJS/NET o NET) se produce la muerte masiva de queratinocitos y células epiteliales de las mucosas; por lo que se acordó, que esta manifestación se lleva a cabo por una reacción inmune no regulada contra las células cutáneas, que las lleva a apoptosis^{41,44}.

Posteriormente, al encontrar que la apoptosis masiva de queratinocitos se presenta en pacientes con SJS, SJS/NET o NET, la mayoría de los estudios se enfocaron en el papel que tienen las células T en el inicio de la reacción inmune, sin dejar de lado la evidencia del papel de otras células (monocitos, macrófagos y queratinocitos), las cuales tienen un rol directo en la citotoxicidad o indirecto por la mediación de citoquinas⁴¹. Para el estudio del papel de las células T en el desarrollo del SJS, SJS/NET y NET, se realizaron análisis de los fluidos de las flictenas de pacientes con el fenotipo, los cuales mostraron, una alta concentración de células linfocíticas con predominio del fenotipo CD8+, sugiriendo así, que la apoptosis podría ser iniciada por CTLs^{45,49,93-95}. Debido a estos hallazgos, de manera consensuada se ha aceptado que las células T del tipo CD8+ juegan un papel central en el desarrollo de SJS o NET.

Sin embargo, el debate no termino allí, seguidamente se buscó encontrar como se llevaba a cabo la activación de las células CTLs, para lo cual se estableció que dicha activación se produce a través de la restricción del MHC⁹³. Aunque, es conocido que moléculas menores a 1 KDa no son inmunogénicas por si mismas, compuestos pequeños como los medicamentos, son capaces de desencadenar una respuesta inmune por parte de las células T^{17,24,26-30}. Se piensa que la generación de metabolitos de estas moléculas, inherentemente más reactivos que el compuesto original, son un componente esencial en el desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos⁹².

Este proceso de bio-activación de medicamentos, con la presencia de metabolitos intermediarios o finales, se ha demostrado para fármacos como fenitoína, carbamazepina y sulfametoxazol^{34,92,96}; sin embargo, se desconocía hasta ese momento el mecanismo por el cual los metabolitos activos de estos medicamentos generaban una respuesta inmune; motivo por el cual se plantearon los conceptos de *hapteno* y *pro-hapteno*, con el fin de explicar la respuesta inmune mediada por células T, a través de la restricción del MHC posterior a la administración un fármaco.

El concepto del *hapteno*, se basa en que compuestos químicamente reactivos se unen de forma covalente a una molécula mas grande (proteína) que es posteriormente reconocida por el sistema inmune²⁹ y el concepto del *pro-hapteno*, tiene como fundamento el que compuestos químicamente no reactivos se metabolizan hacia compuestos reactivos, para convertirse en haptenos³¹. Estos dos conceptos dieron una aproximación inicial al problema de la activación de las células CTLs; sin embargo, esta propuesta de hapteno y pro-hapteno fue posteriormente criticada debido a que se requiere de una gran cantidad de metabolitos activos que reaccionen a nivel de la epidermis para que se produzca una respuesta inmune aumentada⁴¹.

Se sabe que la epidermis carece de vasos sanguíneos, por lo que las células y todos los nutrientes deben atravesar la barrera de la membrana basal de los capilares dérmicos y de las uniones dermo-epidérmicas, y es precisamente por su alta reactividad que estos no pueden transitar libres desde el torrente sanguíneo hacia la epidermis^{41,97}. Del mismo modo, a pesar de demostrar en múltiples estudios que los queratinocitos pueden metabolizar medicamentos y producir metabolitos activos de forma local, esta no es su función principal por lo que las cantidades producidas de estos metabolitos no son las suficientes para iniciar una respuesta inmune⁹⁷.

Recientemente, se tiene evidencia que medicamentos tales como SMX³³, fenobarbital⁹⁸ y lamotrigina⁹⁹ reaccionan con clones específicos de células T, en su forma original, y únicamente lo hacen en ocasionales circunstancias con sus metabolitos reactivos⁴¹. Tal evidencia puede ser explicada por el concepto de la interacción farmacológica de los medicamentos con receptores del sistema inmune (*concepto p-i*), el cual se basa en las características estructurales de los fármacos que les permiten la interacción directa con las células T, sin mediación del hapteno^{24,26}.

Del mismo modo, con el concepto p-i se puede explicar el porque la mayoría de las RAM cutáneas se recuperan con la suspensión de la administración del medicamento, esto debido a que en esta teoría se presenta una asociación lábil del fármaco con el complejo MHC, la cual puede ser interrumpida al detener la ingesta del medicamento y que sería difícil de explicar, si el principal evento en la reacción alérgica fuera la unión covalente a proteínas debido a la vida media larga de estas (concepto del hapteno)³⁶.

Así mismo, el concepto p-i puede dar una explicación al compromiso predominante de la piel en reacciones mediadas por células T como respuesta a la administración sistémica de medicamentos; esto se explica porque la piel posee una alta concentración de células T de memoria, las cuales actúan como células guardianes que pueden ser rápidamente estimuladas por antígenos, así como una amplia red de células dendríticas que actúan como

APC, expresando MHC y predestinando a la piel como el órgano a ser afectado por reacciones de hipersensibilidad³⁰.

Seguidamente, los estudios que intentaban dilucidar el mecanismo que lleva a la muerte masiva de queratinocitos en pacientes con NET, sugirieron que esta ocurre como resultado de la apoptosis, por lo que sumado al hallazgo de CTLs en la epidermis de pacientes con NET se encontraron depósitos abundantes de TNF- α , el cual se conoce que puede inducir una señal apoptótica en células blanco⁴⁴.

La apoptosis difiere de la necrosis en que la primera se lleva a cabo de una manera ordenada, es un proceso activo y genéticamente controlado, el cual permite el desmontaje celular sin inducir una respuesta inflamatoria^{41,44}; mientras que la segunda se asocia con una ausencia radical de las condiciones fisiológicas, sea esta la hipoxia severa o isquemia, entre otras⁴⁴.

Estudios con microscopio electrónico en pacientes con estadios tempranos de NET demostraron cambios morfológicos típicos de las células cuando son generados por apoptosis y al mismo tiempo, el análisis del ADN mostró fragmentación de este en subunidades de 200 pares de bases, un efecto típico de apoptosis sobre la molécula^{41,44}.

Los efectores básicos de la apoptosis son usualmente las caspasas, una familia conservada de cisteína proteasas las cuales se activan por la ligación de los receptores de muerte de la superficie celular, dentro de los que se encuentran el TNF-R y *Fas*⁹³. Ambas moléculas actúan a través de receptores de muerte de superficie celular, los cuales tienen un dominio único transmembrana que es activado cuando el ligando reúne las tres moléculas receptoras (TNF-R, *Fas* y TRAIL-Rs (receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF)), atrayendo la proteína FADD, la cual posteriormente recluta y activa la caspasa 8, la cual a su vez activa la cascada de caspasas que lleva a la apoptosis celular^{41,93}.

Sin embargo, el rol de *Fas-FasL* en la vía de activación durante el SJS, SJS/NET o NET se encuentra en duda, aunque *Fas* es una proteína de superficie la cual se expresa en queratinocitos, la incertidumbre se encuentra sobre el origen de *FasL*⁴¹. En 1998, Viard y cols. demostraron la presencia de *FasL* en la superficie de los queratinocitos de pacientes con NET por lo que formularon la hipótesis de la interacción directa en la superficie celular entre *Fas-FasL*⁵².

Al mismo tiempo demostraron el aumento de las concentraciones de *sFasL*, en todos los pacientes con NET, al evidenciar que los queratinocitos de pacientes con NET inducían apoptosis en células sensibles a *Fas* (Jurkat)^{41,52}. Con este modelo se podrían explicar los altos niveles de *sFasL* en los fluidos de las flictenas y en la sangre periférica de los pacientes

con NET, el cual se podría originar por el clivaje desde la membrana de *FasL* por metaloproteinasas^{41,52}.

No obstante, el papel de *sFasL* durante NET, estos hallazgos aún se encuentran en debate y no deja de existir controversia sobre estos eventos, esto debido a que los estudios con queratinocitos expuestos a los fluidos de las flictenas sin que estuvieran presentes células, únicamente los activados libres de células (ricos en *sFasL*), no se presentó la apoptosis celular, por lo que se evidencia que la muerte celular mediada por células T no requiere de la interacción entre Fas-FasL⁴¹, proponiéndose que debe haber un mecanismo diferente que explique la apoptosis.

Del mismo modo, Abe y cols. criticaron los estudios realizados por Viard y cols. debido a que no les fue posible reproducir sus resultados y, por el contrario, hallaron que las PBMCs producen el *sFasL* el cual se puede unir a la superficie de los queratinocitos, incluso normales, y activar la cascada de caspasas, un fenómeno que es completamente bloqueado por anticuerpos anti-FasL^{41,53}. Al mismo tiempo reportaron que el *sFasL* sérico también puede estar elevado en otras enfermedades como hepatitis B, por ejemplo, por lo que si bien, juega un papel importante en la patogénesis de SJS o NET, otros factores también pueden estar relacionados⁵⁴.

Independiente al mecanismo de apoptosis por vía de los receptores de muerte celular, se encuentra el mecanismo de daño mitocondrial, el cual resulta de la perturbación del balance de proteínas pro y anti-apoptóticas⁹³. Un ejemplo de estas proteínas pro-apoptóticas son las granzimas, las cuales pertenecen a la familia de las serina proteasas y son componentes importantes de los gránulos de CTL y células NK⁹³. La exocitosis de los gránulos de la membrana de los CTLs libera al espacio comprendido entre el CTL y la célula blanco la granzima y la perforina⁴¹.

De las granzimas, la del tipo B es la más abundante y potente en términos de apoptosis, encontrándose en niveles elevados en los fluidos de las flictenas de los pacientes con NET⁴⁸ e induciendo la apoptosis por la vía dependiente de caspasas (escindiendo a la proteína Bid) o independiente de estas luego de que monómeros de perforina (expresada por CTLs) se polimerizan dentro de la membrana de la célula blanco formando un poro^{41,93}. La perforina, aumenta en estadios tempranos de la enfermedad soportando el papel que juegan las células T en las RAM^{41,48}.

Más recientemente, Chung y cols. en 2008 demostraron que la proteína *granulisina* tiene una alta expresión en las células de las flictenas de los pacientes con SJS/NET; a su vez, esta proteína juega un papel importante como molécula citotóxica mayor, pudiendo ser la responsable de la amplia apoptosis de los queratinocitos en estos pacientes⁵⁰. La *granulisina* es una proteína citolítica catiónica, de 15kDa, secretada extracelularmente por

CTLs y células NK; la cual no solo se comporta como una proteína citotóxica sino que además sirve como molécula quimio-atrayente para linfocitos T, monocitos y otras células inflamatorias, así como activador pro-inflamatorio, lo que sugiere su papel crucial en la inmunidad celular^{41,50}.

El alto nivel de *granulisina* en las lesiones de flictenas de la piel explica la escasa infiltración de las células mononucleares en la histopatología del SJS o NET, lo que resulta en una extensa necrosis epidérmica^{6,50}.

Por otra parte, como se vio antes, la respuesta inmune mediada por células T que ocurre luego de la administración un fármaco, es llevada a cabo a través de la restricción del MHC, lo que podría explicar la dependencia étnica de estas reacciones, tal y como se ha mostrado recientemente con los hallazgos de la asociación entre el marcador genético, *antígeno leucocitario humano HLA-B*15:02* y el SJS inducido por carbamazepina en la población de chinos Han^{41,42}.

El MHC comprende una cohorte poligénica y polimórfica de genes involucrados en el reconocimiento inmune. El *locus* del MHC en humanos se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31), abarca una pequeña región de 4Mb dentro de la cual sus genes se encuentran organizados conforme a la estructura y propiedades inmunológicas de sus productos^{55,57}. Basados en estas diferencias los genes se distribuyen en tres clases, los de clase I y II corresponden a genes del HLA, mientras que los de clase III codifican proteínas que no tienen relación funcional con los genes del HLA y no actúan para determinar histocompatibilidad o una respuesta inmunitaria⁵⁹.

Los genes de la clase I (*HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*) codifican proteínas que son parte integrante de la membrana plasmática de todas las células nucleadas^{57,59,60}. Estos genes se encuentran organizados de acuerdo a la estructura de sus productos; el primer exón codifica la secuencia líder, los siguientes tres exones, codifican para los dominios externos de la proteína ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente), el quinto exón, codifica el dominio transmembrana y los últimos exones, codifican juntos el dominio citoplásmico⁵⁷.

Los genes de la clase I muestran un gran nivel de polimorfismo el cual se presenta principalmente en los exones 2 y 3, más específicamente en la región que codifica para los residuos de aminoácidos del SRA, permitiendo una alta especificidad en la unión del péptido⁶¹. El exón 4 es altamente conservado debido a que este codifica el dominio $\alpha 3$ que es importante para dar el soporte estructural a la proteína⁵⁷. Sin embargo, los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ unen mas que péptidos, algunos residuos están en contacto directo con el $\alpha\beta$ -TCR estableciendo las bases fundamentales de la restricción del MHC⁶⁰.

Las proteínas del MHC de la clase I consisten en heterodímeros compuestos por una cadena pesada (α) con tres dominios externos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y una cadena liviana que aporta la β_2m ^{56,57}. El gen β_2m se halla fuera del MHC, en el cromosoma 15, posee cuatro exones y codifica para una proteína de 12 kD, la cual tiene una doble función: sirve de transportador hacia la superficie celular del heterodímero (α - β_2m) y ayuda a expresar la función inmune mediante la unión estable del péptido⁶⁰.

En general, las moléculas del MHC clase I se han convertido en un receptor con múltiples sitios de unión los cuales interactúan con la proteína β_2m , el péptido, el TCR- $\alpha\beta$ y el CD8 con el fin de estimular una respuesta de células T citotóxicas⁶⁰. Es por esta razón y por la importante asociación observada en distintos estudios con las RAM cutáneas severas, que el presente estudio se basa en el análisis de los genes del MHC de la clase I, más específicamente en el gen *HLA-B* con el fin de encontrar variantes alélicas que puedan estar relacionadas con el fenotipo (SJS, SJS/NET o NET) en la población colombiana^{42,64,66,70,71}.

Recientemente, se han reportado los alelos HLA-B*15:02, HLA-B*58:01 y HLA-B*57:01 como biomarcadores prometedores para discriminar pacientes con alto riesgo de reacciones de hipersensibilidad a medicamentos tales como carbamazepina, alopurinol o abacavir, respectivamente⁶³⁻⁶⁵.

En el 2004 Chung y cols. encontraron una fuerte asociación entre el alelo HLA-B*15:02 y el fenotipo SJS causado por carbamazepina en la población de chinos Han del oriente Asiático, por lo que fue considerado como el marcador de HLA más importante asociado al desarrollo de ese fenotipo en esa población⁴². Del mismo modo, la participación del HLA-B*15:02 también fue detectada en SJS ó NET, causados por otros agentes anticonvulsivantes aromáticos (como carbamazepina, fenitoína y lamotrigina), en poblaciones de chinos Han de Hong Kong, población Thai e hindúes⁶⁷⁻⁶⁹. Sin embargo, esta asociación entre el alelo HLA-B*15:02 y el SJS o NET, inducido por carbamazepina, no fue detectada en pacientes de otras poblaciones como Caucásicos ni Japoneses^{11,63}; esto se explicó por la baja frecuencia alélica en estas poblaciones y llevó a pensar que la expresión deletérea estaría restringida a poblaciones con ancestría derivada del sureste asiático^{5,64}.

Del mismo modo, se encontró asociación con el alelo HLA-B*58:01 y el SJS ó NET inducido por el medicamento hipouricemiante alopurinol, en pacientes chinos Han de Taiwán, en caucásicos y en japoneses^{63,70,71}; así como para el alelo HLA-B*57:01 y el síndrome de hipersensibilidad producido tras la administración del inhibidor de la transcriptasa inversa abacavir en pacientes caucásicos⁶⁴.

Sin embargo, a pesar de encontrar asociación con los alelos HLA-B*58:01 y HLA-B*57:01 y las RAM cutáneas severas inducidas por medicamentos como alopurinol y abacavir, esta asociación es mas fuerte en algunos grupos étnicos (HLA-B*58:01 en chinos de Taiwán y

HLA-B*57:01 en caucásicos), lo que sugiere que al igual que otros alelos del HLA, estos no se encuentran representados de igual manera en todas las poblaciones^{64,65}, y por lo tanto aunque podrían ser considerados como biomarcadores para el desarrollo de las RAM cutáneas severas secundarias a la administración de alopurinol y abacavir su asociación estaría condicionada a diferencias étnicas⁵.

El presente estudio es hasta el momento el análisis genético en Colombia con más pacientes en el que se revela una variedad de alelos de HLA-B en pacientes afectados por SJS, SJS/NET o NET. No obstante, no se encontraron asociaciones estadísticamente significantes entre alelos del gen B del HLA y las patologías de estudio (SJS, SJS/NET y NET), como si se han informado en otras poblaciones^{42,63,67,69,100}.

Los alelos más frecuentes observados en el presente estudio fueron B*44:03, B*07:02, B*40:02 y B*35:01, de los cuales el más frecuente fue el B*44:03 con una frecuencia alélica de 13.89% y cuyo valor de *Fis* (0.3289), cercano a uno, es una consecuencia de la endogamia, que se explicaría por el hallazgo de un paciente en estado homocigoto para este alelo (paciente *M2*); los valores de *Fis* para los otros alelos (B*07:02, B*40:02 y B*35:01) se encuentran en un valor negativo, lo que indicaría un exceso de heterocigotos.

En general, no se encuentra ninguna asociación entre los alelos del loci HLA-B y el fenotipo de SJS, SJS/NET o NET (valor de *p* 0.6141) y al mirar el *Fis* en toda la población, esta se encuentra cercana a cero (0.0302) indicando que la población se encuentra cercana al equilibrio.

En el presente estudio se encontró que la paciente *M18* (mujer de 18 años de edad) presentó una RAM cutánea severa tipo NET, luego de la administración de Pirimetamina/Sulfadoxina para tratamiento de toxoplasmosis ocular, mientras se encontraba en periodo de lactancia de su hijo de 1 año de edad (*M19*) quien también resultó afectado con una RAM cutánea menos severa, del tipo SJS; esto se debe seguramente al paso del medicamento a través de la leche materna.

La presentación familiar de SJS/NET en los pacientes *M18* y *M19* es infrecuente, pero da evidencia de la susceptibilidad genética entre la madre y el hijo a presentar el cuadro clínico de manera secundaria a la administración de un medicamento, tal y como se ha evidenciado en casos de gemelos monocigotos en los que se observa una reacción alérgica muco-cutánea posterior a la administración de carbamazepina⁴. Aunque en el caso expuesto en el presente estudio se trata de una probable herencia materna (madre e hijo), los cuales comparten la mitad del material genético, da evidencia para afirmar que se trata de una patología con herencia multifactorial, con un componente genético importante (presumiblemente poligénico) y un componente ambiental que aunque menos importante también puede jugar un rol en el desarrollo de la enfermedad.

Aunque ambos pacientes comparten el alelo HLA-B*44:03 en estado heterocigoto, es incierto proponer a este alelo como un factor de riesgo, puesto que los estudios de poblaciones sanas que analizan los diferentes *loci* del HLA, con métodos de baja resolución, han informado que el alelo HLA-B*44 (grupo de alelo sin diferenciar los subtipos de proteínas específicas)⁶², se encuentra en el 11.1% de la población sana de Colombia⁸⁴. Al comparar esta frecuencia alélica con la del presente estudio, donde la frecuencia del HLA-B*44:02 fue de 2.78% y la del HLA-B*44:03 en el 13.89%, la sumatoria de las dos frecuencias alélicas alcanzaría 16.67%, una diferencia no significativa (valor de p 0.2905).

En la población colombiana solo se han reportado estudios con un análisis de baja resolución para el *loci* HLA-B encontrándose una frecuencia baja para el alelo HLA-B*44 (rango entre: 0.070 – 0.111)⁸⁴⁻⁸⁹ con respecto a la encontrada en el presente estudio (0.1667). Sin embargo, no se puede hacer una adecuada comparación puesto que estos estudios difieren con respecto al nuestro en la resolución del análisis de los alelos, además carecen de información relevante con respecto a las características clínicas concernientes a reacciones adversas cutáneas a medicamentos y al mismo tiempo se desconoce si estas personas se encontraban bajo algún tratamiento farmacológico específico⁸⁴⁻⁸⁹

Al considerar los medicamentos relacionados con el desarrollo del fenotipo, mas de la mitad se asociaron con la administración de anticonvulsivantes y antibióticos (36 y 26% respectivamente); sin embargo, no se encontró una sobre-representación de alelos específicos que se puedan proponer como relacionados con un fármaco en particular, excepto para *Urtica doica*, (5.56%) un compuesto de origen natural, cuyo genotipo fue homocigoto para el alelo HLA-B*44:03 en el paciente M2.

La población colombiana es genéticamente heterogénea, lo que es debido a la compleja historia de mezcla y la participación de ascendencia nativa Americana, Europea y Africana¹⁰¹. A pesar de este mestizaje, la frecuencia del alelo HLA-B*15:02 en los pacientes estudiados fue muy baja por lo que no se puede afirmar que este alelo sea representativo como causa de RAM cutáneas severas en nuestra población.

El análisis de comparación pareada entre poblaciones colombianas sanas estimo una gran similitud entre la población estudiada en el presente trabajo y las poblaciones estudiadas por Arias-Murillo⁸⁴ el cual incluyó a personas de distintas ciudades de Colombia como Bogotá, Cali, Barranquilla, Medellín, Villavicencio, Armenia, Bucaramanga y Neiva (F_{st} = -0.00291, valor de p 0.49550), la cual es similar a nuestra población en donde la mayoría de nuestros pacientes también se encontraban en diferentes ciudades (Bogotá D.C, Tolima, Valle del Cauca, Caldas, Cesar, Meta y Nariño). Con respecto a la similitud entre otras poblaciones de América se encontró la mayor de estas con la población de hispanos en los Estados unidos de América (F_{st} = -0.00093, valor de p 0.50450).

De este modo, fenómenos moleculares, genéticos y fisiológicos de la región del HLA lo hacen un sistema ejemplar en el estudio de la evolución de genes que predisponen a una enfermedad; sin embargo, la complejidad del sistema hace que sea un reto el entender la acción y el modo de herencia de la predisposición de una enfermedad que está ligada a un alelo o *locus* del HLA⁶¹.

Las RAM cutáneas severas, al ser enfermedades complejas, no se escapan de ser entidades en las cuales se encuentran involucradas en su fisiopatología distintos genes, los cuales pueden jugar roles diferentes en la susceptibilidad o en la causación de la enfermedad. Aunque variaciones de alelos en el *locus* HLA-B pueden estar involucrados en los mecanismos de desarrollo de la enfermedad, estos muy seguramente no son la única causa en todas las poblaciones humanas y se deben estudiar otros genes o factores relacionados con la apoptosis o con moléculas co-estimuladoras que puedan estar involucradas en la interacción entre los metabolitos de medicamentos, las APC y las células T.

Se propone el estudio de genes como granulicina (*GNLY*), su producto, la proteína *granulicina* es una molécula citotóxica mayor, responsable de la amplia apoptosis de queratinocitos, la cual presenta una alta expresión en las células de flictenas de pacientes con SJS o NET⁵⁰. Del mismo modo, se propone el estudio del gen del receptor de células T (*TRA* y *TRB*) el cual reconoce antígenos extraños que han sido procesados como péptidos pequeños y que se unen al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC) originando una reacción de hipersensibilidad²⁴.

Sin embargo, no es suficiente el estudio de las variantes de regiones codificantes de los genes que se cree puedan estar relacionados en la fisiopatología de la enfermedad; esto debido a que es una patología con una herencia compleja (herencia multifactorial) en la cual se encuentran involucrados factores genéticos y ambientales, y a pesar de encontrar en algunas poblaciones alelos susceptibles al desarrollo de la enfermedad posterior a la administración de medicamentos específicos, estos están lejos de ser universales.

Si bien, se han identificado algunos factores genéticos involucrados el desarrollo de la enfermedad, persisten preguntas sin respuesta, posiblemente esto debido a la interacción de genes de manera aditiva, donde probablemente habrán genes mayores o de alta penetrancia (por ejemplo *HLA-B* y/o *GNLY*) y otros de menor penetrancia (por ejemplo *TNF*, *IFNG*, *TRA* o *TRB*) en la determinación del rasgo; por este motivo, se debe combinar el estudio de variaciones en las regiones codificantes de los distintos genes involucrados con estudios de expresión con el fin de probar los efectos de estas variantes en la expresión génica.

El estudio combinado de la genotipificación y la expresión de los distintos genes relacionados con esta patología podrá llevar a encontrar biomarcadores genéticos universales, que estén presentes en todas las poblaciones y al alcance de la práctica clínica para la predicción y el diagnóstico eficaz de este tipo de enfermedades.

10. CONCLUSIONES

Los resultados anteriormente mencionados describen la primera genotipificación del *locus* HLA-B de alta resolución en pacientes colombianos afectados por RAM cutáneas severas secundarias a medicamentos. Nuestros hallazgos no revelan asociación específica con alelos del *locus* HLA-B y los fenotipos SJS, SJS/NET o NET, lo que sugiere que otros factores genéticos, epigenéticos o ambientales aun no reconocidos pueden estar jugando un papel en la patogénesis de la enfermedad.

11. PERSPECTIVAS

Aunque las variantes en el gen HLA pueden estar involucradas en el mecanismo de desarrollo de RAM cutáneas severas estas no serían suficientes para explicar los casos de SJS, SJS/NET o NET secundarios a la administración de medicamentos o sustancias en todas las poblaciones.

Se deben estudiar otros genes relacionados con la apoptosis o con moléculas co-estimuladoras implicadas en la interacción entre las células presentadoras de antígenos y las células T con el fin de encontrar biomarcadores genéticos universales para el desarrollo de RAM cutáneas severas que puedan ser utilizados en la práctica clínica.

La combinación del biomarcador genético HLA con otros biomarcadores podría ser útil para predecir algunas de las RAM cutáneas severas.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Charli Joseph Y, Cruz Fuentes C, Orozco Topete R. Farmacodermias y su relación genotípica. *Dermatología Rev Mex* 2007;51(2):73 - 79.
2. Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(4):309-316.
3. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*. 2000;356(9237):1255-1259.
4. Edwards SG, Hubbard V, Aylett S, Wren D. Concordance of primary generalised epilepsy and carbamazepine hypersensitivity in monozygotic twins. *Postgrad Med J*. 1999;75(889):680-681.
5. Tohkin M, Ishiguro A, Kaniwa N, Saito Y, Kurose K, Hasegawa R. Prediction of severe adverse drug reactions using pharmacogenetic biomarkers. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2010;25(2):122-133.
6. Chung WH, Hung SI. Recent advances in the genetics and immunology of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrosis. *J Dermatol Sci*. 2012;66(3):190-196.
7. Nickoloff BJ. Saving the skin from drug-induced detachment. *Nat Med*. 2008;14(12):1311-1313.
8. Harr T, French LE. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:39.
9. Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *N Engl J Med*. 1994;331(19):1272-1285.
10. French LE. Toxic epidermal necrolysis and Stevens Johnson syndrome: our current understanding. *Allergol Int*. 2006;55(1):9-16.
11. Lonjou C, Thomas L, Borot N, et al. A marker for Stevens-Johnson syndrome ...: ethnicity matters. *Pharmacogenomics J*. 2006;6(4):265-268.
12. Alfirevic A, Jorgensen AL, Williamson PR, Chadwick DW, Park BK, Pirmohamed M. HLA-B locus in Caucasian patients with carbamazepine hypersensitivity. *Pharmacogenomics*. 2006;7(6):813-818.
13. Gatanaga H, Honda H, Oka S. Pharmacogenetic information derived from analysis of HLA alleles. *Pharmacogenomics*. 2008;9(2):207-214.
14. Lee A. *Reacciones adversas a los medicamentos*. Primera edición ed. Barcelona, España: Pharma Editores; 2007.
15. Mallal S, Nolan D, Witt C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*. 2002;359(9308):727-732.
16. Mallal S, Phillips E, Carosi G, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med*. 2008;358(6):568-579.

17. Naisbitt DJ, Gordon SF, Pirmohamed M, Park BK. Immunological principles of adverse drug reactions: the initiation and propagation of immune responses elicited by drug treatment. *Drug Saf.* 2000;23(6):483-507.
18. Pirmohamed M, Park BK. Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(6):298-305.
19. Aronson JK, Ferner RE. Joining the DoTS: new approach to classifying adverse drug reactions. *BMJ.* 2003;327(7425):1222-1225.
20. Thien FC. 3. Drug hypersensitivity. *Med J Aust.* 2006;185(6):333-338.
21. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(5):832-836.
22. Thong BY, Leong KP, Tang CY, Chng HH. Drug allergy in a general hospital: Results of a novel prospective inpatient reporting system. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;90(3):342-347.
23. Pichler WJ. Immune mechanism of drug hypersensitivity. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2004;24(3):373-397, v-vi.
24. Pichler WJ. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002;2(4):301-305.
25. Roujeau JC, Bricard G, Nicolas JF. Drug-induced epidermal necrolysis: Important new piece to end the puzzle. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1277-1278.
26. Pichler WJ, Beeler A, Keller M, et al. Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int.* 2006;55(1):17-25.
27. Pichler WJ, Adam J, Daubner B, Gentinetta T, Keller M, Yerly D. Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms. *Med Clin North Am.* 2010;94(4):645-664, xv.
28. Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park BK. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3 Suppl):S74-81.
29. Pichler WJ, Yawalkar N, Britschgi M, et al. Cellular and molecular pathophysiology of cutaneous drug reactions. *Am J Clin Dermatol.* 2002;3(4):229-238.
30. Schnyder B, Pichler WJ. Mechanisms of drug-induced allergy. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(3):268-272.
31. Pichler W, Yawalkar N, Schmid S, Helbling A. Pathogenesis of drug-induced exanthems. *Allergy.* 2002;57(10):884-893.
32. Landsteiner K, Jacobs J. STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS. *J Exp Med.* 1935;61(5):643-656.
33. Schnyder B, Burkhart C, Schnyder-Frutig K, et al. Recognition of sulfamethoxazole and its reactive metabolites by drug-specific CD4+ T cells from allergic individuals. *J Immunol.* 2000;164(12):6647-6654.
34. Cribb AE, Spielberg SP. Sulfamethoxazole is metabolized to the hydroxylamine in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1992;51(5):522-526.

35. Lavergne SN, Wang H, Callan HE, Park BK, Naisbitt DJ. "Danger" conditions increase sulfamethoxazole-protein adduct formation in human antigen-presenting cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(2):372-381.
36. Schnyder B, Mauri-Hellweg D, Zanni M, Bettens F, Pichler WJ. Direct, MHC-dependent presentation of the drug sulfamethoxazole to human alphabeta T cell clones. *J Clin Invest*. 1997;100(1):136-141.
37. Burkhart C, Britschgi M, Strasser I, et al. Non-covalent presentation of sulfamethoxazole to human CD4+ T cells is independent of distinct human leucocyte antigen-bound peptides. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(11):1635-1643.
38. Merk HF. Drug skin metabolites and allergic drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9(4):311-315.
39. Baron JM, Merk HF. Drug metabolism in the skin. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1(4):287-291.
40. Segal AR, Doherty KM, Leggott J, Zlotoff B. Cutaneous reactions to drugs in children. *Pediatrics*. 2007;120(4):e1082-1096.
41. Lissia M, Mulas P, Bulla A, Rubino C. Toxic epidermal necrolysis (Lyell's disease). *Burns*. 2010;36(2):152-163.
42. Chung WH, Hung SI, Hong HS, et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature*. 2004;428(6982):486.
43. Roujeau JC. The spectrum of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a clinical classification. *J Invest Dermatol*. 1994;102(6):28S-30S.
44. Paul C, Wolkenstein P, Adle H, et al. Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol*. 1996;134(4):710-714.
45. Nassif A, Bensussan A, Boumsell L, et al. Toxic epidermal necrolysis: effector cells are drug-specific cytotoxic T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(5):1209-1215.
46. Chung WH, Hung SI. Genetic markers and danger signals in stevens-johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Allergol Int*. 2010;59(4):325-332.
47. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. 2009;6(1):15-25.
48. Posadas SJ, Padial A, Torres MJ, et al. Delayed reactions to drugs show levels of perforin, granzyme B, and Fas-L to be related to disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(1):155-161.
49. Nassif A, Bensussan A, Dorothée G, et al. Drug specific cytotoxic T-cells in the skin lesions of a patient with toxic epidermal necrolysis. *J Invest Dermatol*. 2002;118(4):728-733.
50. Chung WH, Hung SI, Yang JY, et al. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Nat Med*. 2008;14(12):1343-1350.
51. Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French LE. Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol*. 2000;115(2):141-148.
52. Viard I, Wehrli P, Bullani R, et al. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science*. 1998;282(5388):490-493.

53. Abe R. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome: soluble Fas ligand involvement in the pathomechanisms of these diseases. *J Dermatol Sci.* 2008;52(3):151-159.
54. 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(5):992-1000.
55. Ronaldson KJ, McNeil JJ. Improving drug safety by locating genetic markers for hypersensitivity reactions. *Med J Aust.* 2009;190(11):641-643.
56. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 1994;76(2):287-299.
57. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. *LEWIN'S GENES X*. Sudbury, Massachusetts: Jones and Barlett Publishers; 2011.
58. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(10):702-709.
59. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson. Genética en Medicina Vol 7ª* Edición. España: Elsevier Masson; 2008.
60. Kostyu DD, Hannick LI, Traweek JL, Ghanayem M, Heilpern D, Dawson DV. HLA class I polymorphism: structure and function and still questions. *Hum Immunol.* 1997;57(1):1-18.
61. Thomson G. HLA population genetics. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1991;5(2):247-260.
62. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>.
63. Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, et al. HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Pharmacogenomics.* 2008;9(11):1617-1622.
64. Pavlos R, Mallal S, Phillips E. HLA and pharmacogenetics of drug hypersensitivity. *Pharmacogenomics.* 2012;13(11):1285-1306.
65. Profaizer T, Eckels D. HLA alleles and drug hypersensitivity reactions. *Int J Immunogenet.* 2012;39(2):99-105.
66. Génin E, Schumacher M, Roujeau JC, et al. Genome-wide association study of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in Europe. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:52.
67. Locharernkul C, Loplumlert J, Limotai C, et al. Carbamazepine and phenytoin induced Stevens-Johnson syndrome is associated with HLA-B*1502 allele in Thai population. *Epilepsia.* 2008;49(12):2087-2091.
68. Man CB, Kwan P, Baum L, et al. Association between HLA-B*1502 allele and antiepileptic drug-induced cutaneous reactions in Han Chinese. *Epilepsia.* 2007;48(5):1015-1018.
69. Mehta TY, Prajapati LM, Mittal B, et al. Association of HLA-B*1502 allele and carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome among Indians. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009;75(6):579-582.
70. Lonjou C, Borot N, Sekula P, et al. A European study of HLA-B in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis related to five high-risk drugs. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(2):99-107.

71. Hung SI, Chung WH, Liou LB, et al. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(11):4134-4139.
72. Mockenhaupt M, Messenheimer J, Tennis P, Schlingmann J. Risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in new users of antiepileptics. *Neurology*. 2005;64(7):1134-1138.
73. Jeung YJ, Lee JY, Oh MJ, Choi DC, Lee BJ. Comparison of the causes and clinical features of drug rash with eosinophilia and systemic symptoms and stevens-johnson syndrome. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010;2(2):123-126.
74. Laffitte E, Nenadov Beck M, Hofer M, Hohl D, Panizzon RG. Severe Stevens-Johnson syndrome induced by contrast medium iopentol (Imagopaque). *Br J Dermatol*. 2004;150(2):376-378.
75. Brown M, Yowler C, Brandt C. Recurrent toxic epidermal necrolysis secondary to iopromide contrast. *J Burn Care Res*. 2013;34(1):e53-56.
76. F RMaR. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*. 1995;86:248-249.
77. Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementatation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*. 2008;8:103-106.
78. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: a software for population genetic analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland*. 2000.
79. GILLESPIE JH. *Population genetics: A concise guide*. Second edition. ed. Baltimore, United States of America.: The John Hopkins University press.; 2004. .
80. <http://www.real-statistics.com/correlation/basic-concepts-correlation/>.
81. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;131(2):479-491.
82. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D913-919.
83. Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernández-Viña MA. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum Immunol*. 2001;62(9):1009-1030.
84. Arias-Murillo YR, Castro-Jimenez MÁ, Ríos-Espinosa MF, López-Rivera JJ, Echeverry-Coral SJ, Martínez-Nieto O. Analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allelic, genotipic, and haplotypin frequencies in colombian population. *Colombia Médica*. 2010;41:336-343.
85. Ossa H, Manrique A, Quintanilla S, Peña A. Polimorfismos del sistema HLA (loci A*, B* y DRB1*) en población colombiana. *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA*. 2007;5:25 - 30.
86. Bermeo S, Guerra M, Alfonso H. Frecuencias de HLA-A, B y DRB1 en una población de Huila-Colombia. *Revista Facultad de Salud - RFS*. 2010;2(1):9 - 19.

87. Arrunategui AM, Villegas A, Ocampo LA, Rodríguez LM, Badih A. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y clase II en donantes de una población del suroccidente colombiano. *Acta Medica Colombiana*. 2013;38(1):16-21.
88. Rodríguez L, Giraldo M, García N, et al. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos. Medellín, Colombia. *Biomédica*. 2007;27:437 - 547.
89. Fleischhauer K, Zino E. HLA-A, -B and -Cw Allele Frequencies in Two Populations from Colombia. *Human Immunology*. 2004;65:906 - 908.
90. Arnaiz-Villena A, Reguera R, Parga-Lozano C, et al. HLA Genes in Afro-American Colombians (San Basilio de Palenque): The First Free Africans in America. *The Open Immunology Journal*. 2009;2:59 - 62.
91. Silvera C, Vargas-Alarcon G, Areces C, et al. HLA genes in Wayu Amerindians from Colombia. *Immunol Invest*. 2011;40(1):92-100.
92. Leeder JS. Mechanisms of idiosyncratic hypersensitivity reactions to antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 1998;39 Suppl 7:S8-16.
93. Chave TA, Mortimer NJ, Sladden MJ, Hall AP, Hutchinson PE. Toxic epidermal necrolysis: current evidence, practical management and future directions. *Br J Dermatol*. 2005;153(2):241-253.
94. Miyauchi H, Hosokawa H, Akaeda T, Iba H, Asada Y. T-cell subsets in drug-induced toxic epidermal necrolysis. Possible pathogenic mechanism induced by CD8-positive T cells. *Arch Dermatol*. 1991;127(6):851-855.
95. Correia O, Delgado L, Ramos JP, Resende C, Torrinha JA. Cutaneous T-cell recruitment in toxic epidermal necrolysis. Further evidence of CD8+ lymphocyte involvement. *Arch Dermatol*. 1993;129(4):466-468.
96. Cribb AE, Spielberg SP. Hepatic microsomal metabolism of sulfamethoxazole to the hydroxylamine. *Drug Metab Dispos*. 1990;18(5):784-787.
97. Roujeau JC. Immune mechanisms in drug allergy. *Allergol Int*. 2006;55(1):27-33.
98. Hashizume H, Takigawa M, Tokura Y. Characterization of drug-specific T cells in phenobarbital-induced eruption. *J Immunol*. 2002;168(10):5359-5368.
99. Naisbitt DJ, Farrell J, Wong G, et al. Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(6):1393-1403.
100. Ikeda H, Takahashi Y, Yamazaki E, et al. HLA class I markers in Japanese patients with carbamazepine-induced cutaneous adverse reactions. *Epilepsia*. 2010;51(2):297-300.
101. Rojas W, Parra MV, Campo O, et al. Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *Am J Phys Anthropol*. 2010;143(1):13-20.