



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Farmacogenética de las reacciones cutáneas
adversas a lamotrigina**

Tesis que presenta

Ana María Peña Balderas

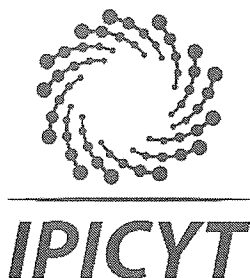
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., agosto de 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Farmacogenética de las reacciones cutáneas adversas a lamotrigina***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ana María Peña Balderas** y aprobada el veintiocho de agosto del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Director de la tesis

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial

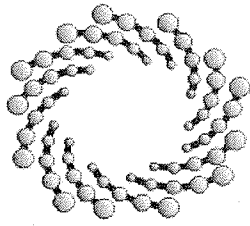
Dr. Idefonso Rodríguez Leyva
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén Hipólito López Revilla.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 636073).



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 200 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de agosto del año 2019, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

Presidente

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

Secretario

Dr. Ildelfonso Rodríguez Leyva

Sinodal externo

**IPICYT
IPICYT
Hospital
Central
"Ignacio
Morones
Prieto"**

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ana María Peña Balderas

sobre la Tesis intitulada:

Farmacogenética de las reacciones cutáneas adversas a lamotrigina

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 28 días del mes de agosto de 2019.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A la memoria de mi abuelita Juanita Balderas a quien quise, quiero y querré siempre. Gracias abuelita por cuidarme cuando más te necesité y por formar parte importante de mi niñez. Sin tu cariño, enseñanzas y amor no sería la persona que soy hoy.

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Dr. Rubén Hipólito López Revilla, por su confianza, enseñanzas, apoyo incondicional y motivación.

A la Biol. Mireya Sánchez Garza, técnico académico del Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria, por brindarme sus conocimientos, su paciencia y ser una guía durante mi estancia.

A mis asesores, el Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga y el Dr. Ildfonso Rodríguez Leyva, por su colaboración, dirección y conocimientos.

A mi mamá Eloisa Balderas por ser mi mejor amiga, por todo el amor que me da, por su apoyo incondicional y por su esfuerzo mantenido a través de los años para que yo pudiera lograr cada uno de mis sueños y estar donde estoy el día de hoy. Te amo mamá.

A mi novio Hugo Andrés Pérez Guerrero por ser mi confidente y compañero, por inspirarme, motivarme y creer en mí, por tus consejos y palabras de aliento, por apoyarme siempre y extenderme tu mano en momentos difíciles, pero sobre todo por tu amor.

A la técnico Gloria Alicia López Niño por su gran trabajo en el laboratorio que hace posible el mío. Gracias por escucharme, alentarme y aconsejarme, pero sobre todo por tu sincera amistad.

A todos mis profesores de la maestría en Biología Molecular por su dedicación, por transmitirme sus conocimientos e incentivarme a seguir adelante.

A mis compañeros de maestría por su amistad y por hacer esta experiencia más amena y divertida.

Al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) por los servicios de secuenciación prestados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca que hizo posible este trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta del examen	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras.....	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract.....	xiii
Introducción.....	1
Epilepsia	1
Lamotrigina.....	2
Reacciones cutáneas adversas a fármacos antiepilépticos.....	3
Farmacogenética de las RCAM por lamotrigina	6
<i>El sistema HLA.....</i>	<i>6</i>
<i>Variantes alélicas del sistema HLA asociadas a RCAM por lamotrigina</i>	<i>10</i>
Material y métodos	12
Variantes alélicas de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-C</i> asociadas a RCA por LTG	12
Segmentos de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-C</i> que contienen las secuencias de las variantes alélicas relevantes.....	12
Oligonucleótidos seleccionados para generar los amplicones de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-C</i>	12
Montaje y optimización de las mezclas de PCR para generar los amplicones <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-C</i>	13
Purificación y cuantificación de los amplicones.....	14
Clonación del amplicón <i>HLA-B</i>	14
Secuenciación de los amplicones	16
Secuencia de los amplicones e identificación de las variantes alélicas	16
Resultados	18
Variantes alélicas asociadas a RCA por LTG.....	18
Delimitación de los segmentos de interés de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-C</i> y sus respectivos amplicones.....	18
Condiciones de PCR para generar los amplicones	18
Clonación y secuenciación del amplicón <i>HLA-B</i>	27
Variantes alélicas identificadas en los amplicones.....	27
Discusión	32
Referencias	34
Artículo publicado.....	37
Peña Balderas AM, López-Revilla R (2019) Pharmacogenetics of adverse cutaneous reactions to lamotrigine. Rev Mex Neuroci 20(4):200-206. DOI: 10.24876/RMN.19000061	37

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de las reacciones adversas a medicamentos y ejemplos de las inducidas por fármacos antiepilépticos. Adaptada de Fricke-Galindo et al. (2015)..	5
Tabla 2. Composición de las mezclas de PCR (25 µL) optimizadas para los amplicones HLA-A, -B y -C.....	15
Tabla 3. Programas del termociclador optimizados para los amplicones HLA-A, -B y -C.	15
Tabla 4. Alelos y haplotipos <i>HLA</i> de clase I asociados a reacciones cutáneas adversas a lamotrigina en diversos grupos étnicos.....	19
Tabla 5. Alelos y haplotipos <i>HLA</i> de clase I asociados a reacciones cutáneas adversas por lamotrigina en mestizos mexicanos (Fricke-Galindo et al. 2014)	20
Tabla 6. Localización y extensión de los segmentos del cromosoma 6 que contienen las secuencias de las variantes alélicas de interés	20
Tabla 7. Oligonucleótidos seleccionados para generar los tres amplicones de interés (Carter et al. 1999)	22

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de la lamotrigina	4
Figura 2. Presentaciones clínicas de las reacciones cutáneas adversas a medicamentos.	7
Figura 3. Región genética del complejo mayor de histocompatibilidad humano.....	8
Figura 4. Genes y moléculas HLA de clase I y clase II.....	11
Figura 5. Diagrama de los amplicones de los genes <i>HLA-A</i> , <i>HLA-B</i> , <i>HLA-C</i> generados en este trabajo.....	21
Figura 6. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas en mezclas de PCR para el amplicón HLA-A con MgCl ₂ 1.5-4.5 mM y annealing de 62.6 a 65.9 °C.....	23
Figura 7. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas en mezclas de PCR para el amplicón HLA-B con MgCl ₂ 3-4.5 mM y annealing de 65.9 a 68.3 °C	24
Figura 8. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas en mezclas de PCR para el amplicón HLA-C con MgCl ₂ 3-4.5 mM y annealing de 62.6 a 68.3 °C	25
Figura 9. Electroferograma de mezclas de PCR para los amplicones HLA-A, -B y -C en condiciones óptimas.....	26
Figura 10. Electroferograma del amplicón HLA-B generado a partir del plásmido pAP100	28
Figura 11. Alineación de la secuencia genómica de la variante alélica <i>HLA-A</i> *24:470 con la del amplicón HLA-A.....	29
Figura 12. Alineación de la secuencia genómica de la variante alélica <i>HLA-B</i> * 07:359 con la del amplicón HLA-B.....	30
Figura 13. Alineación de la secuencia genómica de la variante alélica <i>HLA-C</i> * 04:199 con la del amplicón HLA-C.....	31

Abreviaturas

Amp^R	Resistencia a ampicilina (carbenicilina)
Cb	Carbenicilina
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
EMP	Exantema maculopapular
FAE	Fármacos antiepilépticos
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de EE UU
HLA	Antígeno leucocitario humano
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Lac-	Incapacidad para utilizar lactosa como fuente de carbono
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani
LTG	Lamotrigina
NET	Necrólisis epidérmica tóxica
nt	Nucleótido
pb	Par de bases
PCR	Reacción de polimerización en cadena
RAM	Reacciones adversas a medicamentos
RCA	Reacciones cutáneas adversas
RCAM	Reacciones cutáneas adversas a medicamentos
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Amortiguador de borato de sodio
SCAR	Reacciones adversas cutáneas severas
SSJ	Síndrome de Stevens-Johnson
SSP	[Oligonucleótido] Iniciador secuencia-específico
TA	Temperatura de annealing
TAE	Amortiguador tris-acetato-EDTA
Taq pol	DNA polimerasa termoestable de <i>Thermus aquaticus</i>
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Resumen

Farmacogenética de las reacciones cutáneas adversas a lamotrigina

Contexto. Las reacciones cutáneas adversas (RCA) a fármacos antiepilépticos (FAE) incluyen el exantema maculopapular, el síndrome de Stevens-Johnson y la necrólisis epidérmica tóxica y son un problema de salud pública y una de las causas principales de morbimortalidad por medicamentos. La lamotrigina (LTG) destaca entre los FAE porque no afecta la cognición ni causa sedación. Aunque infrecuentes, las RCA a LTG obligan a abandonar el tratamiento y afectan la calidad de vida de los pacientes y el temor a ellas inhibe la prescripción de LTG a pesar de sus ventajas terapéuticas. En diversas poblaciones se ha encontrado que ciertas variantes alélicas *HLA* asociadas a RCA son fármaco-específicas y que la etnia es importante. Se han descrito 17 variantes alélicas de los genes *HLA-A*, *-B*, y *-C* asociadas a RCA por LTG en diferentes etnias, las cuales incluyen cinco variantes y un haplotipo en mestizos mexicanos. **Objetivo.** Desarrollar un método que identifique las variantes alélicas *HLA* asociadas a RCA por LTG en mestizos mexicanos basado en la secuenciación de los segmentos génicos respectivos. **Métodos.** Delimitamos los segmentos de los genes *HLA-A*, *-B* y *-C* que contienen las secuencias características de las variantes alélicas *HLA* asociadas a RCA por LTG en mestizos mexicanos. Seleccionamos tres parejas de oligonucleótidos para generar por PCR los amplicones *HLA-A* (985 pb), *HLA-B* (943 pb) y *HLA-C* (919 pb), que incluyen las secuencias de las variantes clínicamente relevantes. Determinamos las condiciones de las mezclas de PCR para generar los tres amplicones puros para secuenciarlos con el método de didesoxinucleótidos e identificamos las variantes alélicas de interés mediante análisis bioinformático de la secuencia de los amplicones en la base de datos IMGT/*HLA*. **Resultados.** Las tres parejas de oligonucleótidos seleccionadas generaron los amplicones *HLA-A*, *-B* y *-C* esperados a partir del DNA genómico de un sujeto humano no susceptible a LTG. Clonamos el amplicón *HLA-B* en el vector pGEM y usamos la construcción para generar una cantidad suficiente del inserto para secuenciarlo. Las secuencias de los tres amplicones generados a partir del DNA genómico humano correspondieron a las variantes alélicas *HLA-A*24:470*, *HLA-B*07:359* y *HLA-C*04:199*, que no están asociadas a RCA por LTG. **Conclusiones.** El nuevo método permite identificar las variantes alélicas *HLA-A*, *-B* y *-C* y podrá emplearse para identificar las variantes asociadas a RCA por LTG en mestizos mexicanos, para así excluir del tratamiento con LTG a los pacientes epilépticos potencialmente susceptibles al medicamento. **Palabras clave:** Farmacogenética, fármacos antiepilépticos, lamotrigina, reacciones cutáneas adversas a medicamentos, sistema *HLA*.

Abstract

Pharmacogenetics of adverse cutaneous reactions to lamotrigine

Background. Cutaneous adverse reactions (cADR) to antiepileptic drugs (AEDs) include maculopapular exanthema, Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis; they are a public health problem and one of the leading causes of morbidity and mortality by drugs. Lamotrigine (LTG) stands out among AEDs because it does not affect cognition and does not cause sedation. Although infrequent, cADR to LTG force abandonment of the treatment and affect the quality of life of the patients; furthermore, fear of cADR inhibits LTG prescription despite its therapeutic advantages. In diverse populations have been identified drug-specific HLA allelic variants associated with cADR. Seventeen *HLA-A*, *-B*, and *-C* allelic variants are associated with cADR by LTG in different ethnicities, including five variants and one haplotype in Mexican mestizos. **Objective.** To develop a method to identify the *HLA* allelic variants associated with cADR by LTG in Mexican mestizos, based on the sequencing of the corresponding gene segments. **Methods.** The segments of the *HLA-A*, *-B* and *-C* genes containing the characteristic sequences of the HLA allelic variants associated with cADR by LTG in Mexican mestizos were delimited. Three pairs of oligonucleotides were selected to generate by PCR the amplicons HLA-A (985 bp), HLA-B (943 bp) and HLA-C (919 bp) that include the sequences of the clinically relevant variants. The conditions of PCR mixtures were determined to generate the three pure amplicons in order to sequence them with the dideoxynucleotide method and to identify the allelic variants of interest by bioinformatic analysis of the amplicon sequences in the IMGT/HLA database. **Results.** The three oligonucleotide pairs selected generated the HLA-A, -B and -C amplicons expected from genomic DNA of a human subject not susceptible to LTG. The HLA-B amplicon was cloned in the pGEM vector and the construct was used to generate sufficient amount of the insert for sequencing. The sequences of the three amplicons generated from human genomic DNA corresponded to the allelic variants *HLA-A* 24:470*, *HLA-B*07:359* and *HLA-C*04:199*, not associated with cADR by LTG. **Conclusions.** The new method identifies *HLA-A*, *-B* and *-C* allelic variants and may be used to identify the variants associated to cADR by LTG in Mexican mestizos, in order to exclude from LTG treatment to the epileptic patients potentially susceptible to the drug.

Keywords: Pharmacogenetics, antiepileptic drugs, lamotrigine, adverse drug reactions to drugs, HLA system

Introducción

Los fármacos antiepilépticos (FAE) forman parte de los medicamentos que más comúnmente inducen reacciones cutáneas adversas (RCA) tales como el exantema maculopapular (EMP), el síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) y la necrólisis epidérmica tóxica (NET), con morbilidad y mortalidad significativas. Se estima que la incidencia de SSJ/NET varía de 1 en 1,000 a 10,000 exposiciones a medicamentos y su mortalidad llega a ser hasta del 35%. Las tasas más altas de RCA a medicamentos relacionados con FAE se deben a lamotrigina (LTG), uno de los FAE más nuevos (Shi et al. 2017).

La farmacogenética tiene por objeto identificar los polimorfismos genéticos asociados con la eficacia y seguridad de los medicamentos. Ciertas variantes alélicas del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA, *human leukocyte antigen*) están asociadas a las RCA inducidas por LTG (Fricke-Galindo et al. 2015). La genotipificación de las variantes alélicas del sistema HLA sirve para seleccionar a los pacientes que podrían tolerar y beneficiarse del tratamiento con LTG.

Epilepsia

La epilepsia es una enfermedad cerebral crónica provocada por un desequilibrio en la actividad eléctrica de las neuronas; afecta a unos 70 millones de personas en el mundo y al menos a cinco millones en América Latina. Se caracteriza por una predisposición duradera a generar crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición. La definición de epilepsia requiere la aparición de al menos una crisis epiléptica (Fisher et al. 2005).

Las crisis epilépticas se consideran focales si la actividad eléctrica se origina dentro de redes limitadas a un hemisferio cerebral y se dividen en motoras (con automatismos, atónicas, clónicas, espasmos epilépticos, hipercinéticas, mioclónicas y tónicas) y no motoras (autonómicas, con detención conductual, cognitivas, emocionales y sensoriales) de inicio. Se consideran generalizadas si se originan en las redes corticales y subcorticales en ambos hemisferios cerebrales y se dividen

en motoras (tónico-clónicas, clónicas, tónicas, mioclónicas, mioclónicas-tónico-clónicas, mioclónicas atónicas, atónicas y espasmos infantiles) y no motoras o también denominadas de ausencia (Berg et al. 2010).

La epilepsia tiene diversas etiologías. Cuando clínicamente no es posible definir el inicio de las crisis, éstas se consideran de manera preliminar como de origen desconocido. Las crisis se dividen en estructurales (cuando existe un tumor, una malformación arteriovenosa, un granuloma, etc., que las explique), genéticas, infecciosas, metabólicas, inmunológicas o de causa desconocida (Fisher et al. 2017). La epilepsia estructural también puede deberse a daño cerebral por lesiones prenatales o perinatales (por ejemplo, asfixia o traumatismo durante el parto o bajo peso al nacer), malformaciones congénitas o alteraciones genéticas con malformaciones cerebrales asociadas, traumatismos craneoencefálicos graves, enfermedades cerebrovasculares que limitan la llegada de oxígeno y nutrientes al cerebro, infecciones cerebrales (como meningitis, encefalitis o neurocisticercosis), algunos síndromes genéticos y tumores cerebrales (Shorvon 2011).

El tratamiento de la epilepsia es generalmente farmacológico y accesible. Los medicamentos antiepilépticos tienen el propósito de liberar a los pacientes de las crisis con efectos secundarios mínimos y devolverlos a estilos de vida satisfactorios. Sin embargo, a pesar de numerosos intentos por desarrollar fármacos seguros e inocuos, los fármacos antiepilépticos (FAE) con diferentes mecanismos de acción pueden causar efectos adversos o indeseables. La aparición de reacciones adversas a medicamentos (RAM) en la terapia de la epilepsia dificulta el control de las crisis, obstaculiza la adherencia y promueve la suspensión del tratamiento en un 25% de los casos, con el consecuente aumento del costo e impacto sobre la calidad de vida de los pacientes (Fricke-Galindo et al. 2015).

Lamotrigina

La lamotrigina (LTG) destaca entre los más de 17 FAE aprobados para el tratamiento de la epilepsia focal y generalizada (López et al. 2011; Warshavsky et al. 2016). Fue aprobada por la FDA en 1994 para el tratamiento de crisis focales y generalizadas en niños y adultos (Motte et al. 1997).

La LTG es una feniltiazina (Fig. 1) que pertenece a un grupo de fármacos como carbamazepina, fenitoína y ácido valproico que potencian la inhibición de corriente mediada por los canales de sodio (Beattie et al. 2012). Al despolarizarse una neurona, los canales de sodio se inactivan por un breve período ('período refractario') que bloquea la entrada masiva de sodio; esta inactivación constituye un punto clave en la prevención de descargas recurrentes dentro de un foco epiléptico potencial (Goldsmith et al. 2003).

La mayor ventaja de la LTG es que, a diferencia de otros FAE, no causa deterioro cognitivo y no provoca sedación; además parece tener un efecto antienvjecimiento, pues disminuye la mortalidad y aumenta la esperanza de vida en un modelo animal (Ebrahimi and Ebrahimi 2012).

Reacciones cutáneas adversas a fármacos antiepilépticos

Las RAM son definidas como "la respuesta nociva no intencionada a un fármaco que ocurre con la dosis estándar utilizada en humanos para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad o la modificación de alguna función" (WHO 1972).

Las RAM por FAE representan un serio problema para la salud pública y para los individuos que las sufren ya que su prevalencia varía del 0.7% al 35% y ocurren en el 15% de los pacientes hospitalizados (Fricke-Galindo et al. 2014). Se clasifican de acuerdo con sus mecanismos de patogenia (Tabla 1) y los más comunes son los tipos A y B (Fricke-Galindo et al. 2015).

Las RAM de tipo B son de naturaleza idiosincrática, menos frecuentes, pero más severas que las de tipo A y para controlarlas se requiere la suspensión inmediata del medicamento o incluso un tratamiento adicional. Dentro de ellas se encuentran las reacciones cutáneas adversas a medicamentos (RCAM) cuyas manifestaciones clínicas varían desde el exantema maculopapular (EMP) de gravedad variable, hasta reacciones cutáneas potencialmente mortales que incluyen el síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) y la necrólisis epidérmica tóxica

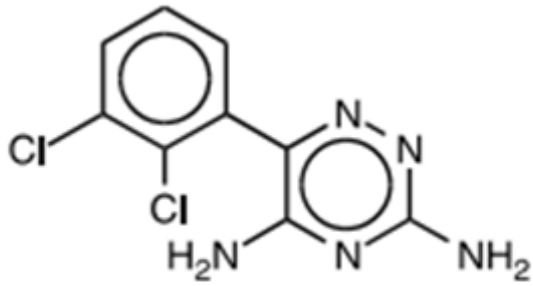


Figura 1. Estructura química de la lamotrigina

PubChem CID: 3878 Nombre químico: 3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina. Fórmula molecular: C₉H₇Cl₂N₅. Peso molecular: 256.09.

Tabla 1. Clasificación de las reacciones adversas a medicamentos y ejemplos de las inducidas por fármacos antiepilépticos. Adaptada de Fricke-Galindo et al. (2015)

Clase	Características	Ejemplos de RAM inducidas por FAE
A	Dosis-dependiente; respuesta farmacológica excesiva; predecibles; reversibles; frecuentes; baja severidad	Mareos, cefalea, temblor, somnolencia, insomnio, vértigo, ataxia, diplopía, depresión, hiponatremia, parestesias, trastornos gastrointestinales
B	No relacionadas con la dosis ni con el mecanismo de acción farmacológico; relacionadas con la vulnerabilidad individual; impredecibles; poco frecuentes; alta morbimortalidad; reversibles	Reacciones cutáneas y de hipersensibilidad (exantema maculopapular leve, síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica, etc.), hepatotoxicidad, anemia aplásica, agranulocitosis
C	Relacionadas con la dosis y el tiempo (acumulación de dosis); poco frecuentes; crónicas; la mayoría son reversibles	Aumento o pérdida de peso, hiperplasia gingival, pérdida visual
D	Relacionadas con el tiempo, usualmente con la dosis y la exposición prenatal; poco frecuentes; irreversibles	Teratogenia
E	Relacionadas con la suspensión del medicamento	Insomnio, ansiedad y trastornos después del retiro súbito de benzodicepinas
F	Falla terapéutica inesperada; frecuentes; relacionadas con la dosis y la interacción de fármacos	Disminución de la concentración plasmática de fármacos por inducción enzimática de terapia concomitante

(NET) (Fig. 2), con mortalidades hasta del 5% para SSJ y del 30% para NET. Ambas son variantes de la misma afección, pero difieren en el porcentaje de pérdida de piel: menos del 10% para SSJ y más del 30% para NET. Una de sus más importantes secuelas es ocular, pues hasta 75% de los pacientes con NET pueden tener complicaciones tan severas como la ceguera (Fricke-Galindo et al. 2015).

Las tasas más altas de RCAM relacionadas con FAE son debidas a LTG, carbamazepina y fenitoína, medicamentos relacionados estructuralmente por un anillo aromático (Fricke-Galindo et al. 2014).

Farmacogenética de las RCAM por lamotrigina

La farmacogenética surgió por diversas observaciones de deficiencias enzimáticas heredables asociadas a la toxicidad de ciertos medicamentos en grupos específicos de individuos. Los estudios farmacogenéticos consideran la asociación de variantes alélicas de los genes que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos, transportadores y receptores de fármacos con variaciones en los requerimientos de dosis, eficacia y desarrollo de RAM (Fricke-Galindo et al. 2015). El conocimiento de la genética individual puede mejorar la elección de la farmacoterapia para evitar efectos indeseables y reacciones adversas en los pacientes (Kalow 2006).

El sistema HLA

Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de humanos, también llamado Sistema HLA, se localizan en el brazo corto del cromosoma 6. Codifican moléculas de superficie celular especializadas en la presentación de péptidos antigénicos a linfocitos T que activan procesos críticos en la generación de la respuesta inmunitaria (Cao et al. 2013).

Las moléculas del CMH presentadoras de antígenos son de dos clases principales: I y II. Las moléculas de clase I son codificadas en la región del extremo telomérico y las de clase II en la región del extremo centromérico; entre ambas se encuentra la región de los genes de clase III, o CMH central, de aproximadamente un millón de pares de bases (Fig. 3).



Figura 2. Presentaciones clínicas de las reacciones cutáneas adversas a medicamentos

(A) Exantema maculopapular. (B) Necrólisis epidérmica tóxica. Las fotos de estos pacientes fueron tomadas y proporcionadas por el Dr. Ildefonso Rodríguez-Leyva.

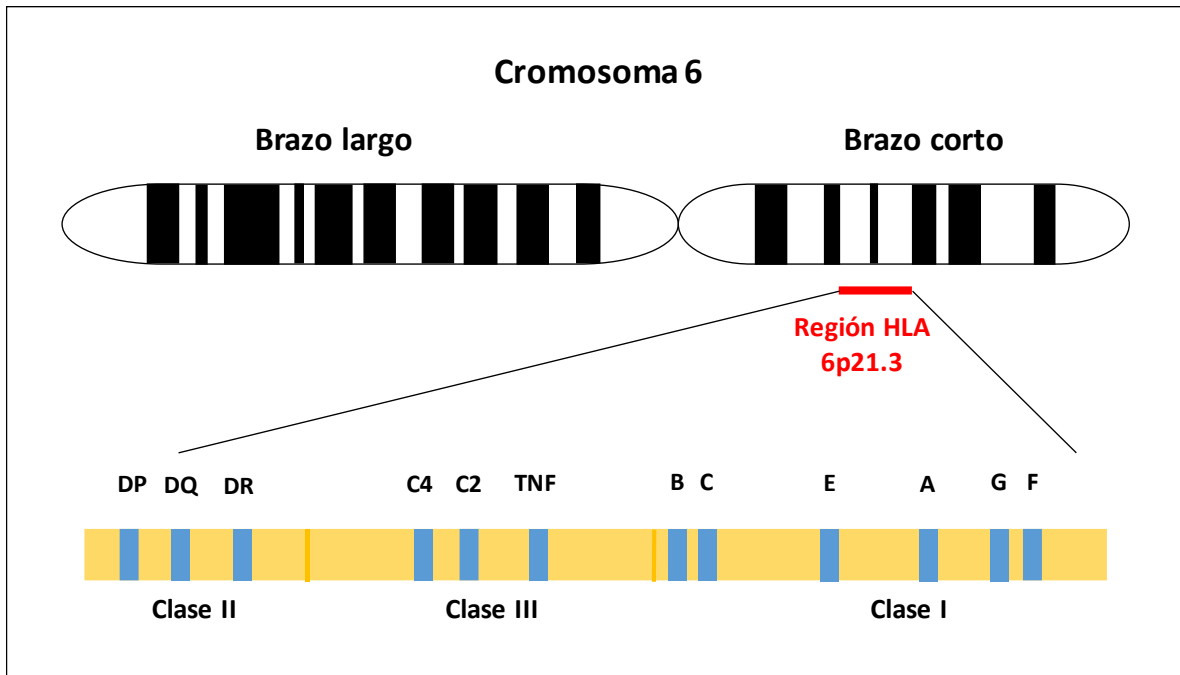


Figura 3. Región genética del complejo mayor de histocompatibilidad humano

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) y ocupa un segmento de DNA que se extiende alrededor de 3600 kilopares de bases. Es una región de genes altamente polimórficos que forman dos grupos: los de clase I (teloméricos) y los de clase II (centroméricos). Las dos regiones están separadas por otro grupo de genes no relacionados, llamados genes de clase III.

La región de clase I codifica las proteínas denominadas antígenos leucocitarios humanos (HLA) clásicos (HLA-A, -B, -C) y no-clásicos (HLA-E, -F, -G). La región de clase II, relativamente homogénea, contiene los genes que codifican las proteínas HLA-DP, DQ y DR, heterodímeros de una cadena alfa y una cadena beta que están presentes en linfocitos B y monocitos. Las regiones de clase I y II del CMH se llaman así principalmente porque contienen los genes HLA, mientras que la región de clase III no tiene esa característica definitoria pues contiene gran cantidad de genes de función variable que participan o no en el sistema inmunitario.

Las familias de genes del CMH han resultado de múltiples eventos de duplicación génica por lo que algunos pares de genes individuales como *HLA-B* y *HLA-C* son casi idénticos (Varney et al. 2012).

Algunos de los riesgos asociados con el sistema HLA son enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la diabetes tipo 1, la enfermedad de Graves, la esclerosis múltiple y las RAM (Gough and Simmonds 2007). Las RCAM son mediadas por mecanismos inmunitarios independientes de la dosis y están asociadas a ciertas variantes alélicas del sistema HLA (Fricke-Galindo et al. 2015).

La función principal del sistema inmunitario es reconocer e iniciar respuestas rápidas y específicas contra los antígenos no propios, pero algunas veces el sistema responde inadecuadamente a un estímulo adecuado y provoca reacciones adversas; las respuestas inadecuadas en las RCAM están asociadas a ciertas variantes alélicas del sistema HLA.

Aunque el mecanismo de las RCAM no está completamente definido, se han propuesto dos teorías para explicarlas: hapteno/prohapteno e interacción fármaco/receptor inmunológico (p-i) (Fricke-Galindo et al. 2015). En el primer caso se plantea que, como para inducir una respuesta inmunológica la molécula de un fármaco es muy pequeña, ésta actúa como hapteno o prohapteno que se convierte en inmunógeno mediante su enlace covalente con proteínas endógenas para formar un complejo hapteno-acarreador. Este complejo es procesado por las células presentadoras de antígeno del CMH localizadas en los ganglios linfáticos y otros tejidos, con lo que se estimula la producción de células T y las consecuentes manifestaciones clínicas. En contraste, la teoría p-i (interacciones de fármacos con

receptores inmunológicos) propone que algunos fármacos se unen directa y reversiblemente (unión no covalente) a receptores del CMH o al receptor de células T para estimular células T específicas para el fármaco inductor (Shirzadi et al. 2015).

En los genes del sistema HLA clásico los exones más polimórficos codifican las moléculas de clase I y II (Fig. 4), por lo cual en los últimos años los estudios farmacogenéticos asociados al desarrollo de RCA por FAE se han centrado en la identificación de los alelos *HLA* de clase I y en menor grado en los de clase II, tomando en cuenta que estudios de asociación en diferentes poblaciones han descrito que los alelos *HLA* asociados a RCAM son fármaco-específicos y que la etnia es importante (Fricke-Galindo et al. 2015).

Variantes alélicas del sistema HLA asociadas a RCAM por lamotrigina

En las décadas transcurridas desde que se aisló el primer gen *HLA* por clonación molecular (cDNA de *HLA-B7*), se han identificado miles de variantes alélicas cuyos nombres y secuencias están incluidos en la base de datos IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/index.html>), herramienta indispensable para todos los sistemas de tipificación de HLA.

El primer intento de tipificación del DNA de *HLA* implicó el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), que tiene muchas limitaciones. El desarrollo de la reacción de polimerización en cadena (PCR) permitió amplificar los exones polimórficos (segundo y tercero) de los genes *HLA* de clase I y clase II y analizar los motivos de secuencia polimórfica con sondas de oligonucleótidos para la hibridación de secuencias específicas (SSO). La inmovilización de estas sondas en membranas y más tarde en partículas esféricas, junto con los primeros conjuntos de iniciadores secuencia-específicos (SSP), dio lugar al conjunto actual de reactivos de tipificación de *HLA* (Erlich 2012).

En este trabajo empleamos PCR seguida de secuenciación de los amplicones para identificar las variantes alélicas de los genes *HLA-A*, *-B* y *-C* asociadas a RCA por LTG y predecir el riesgo individual de RCA por LTG para seleccionar a los pacientes que puedan ser tratados con el medicamento.

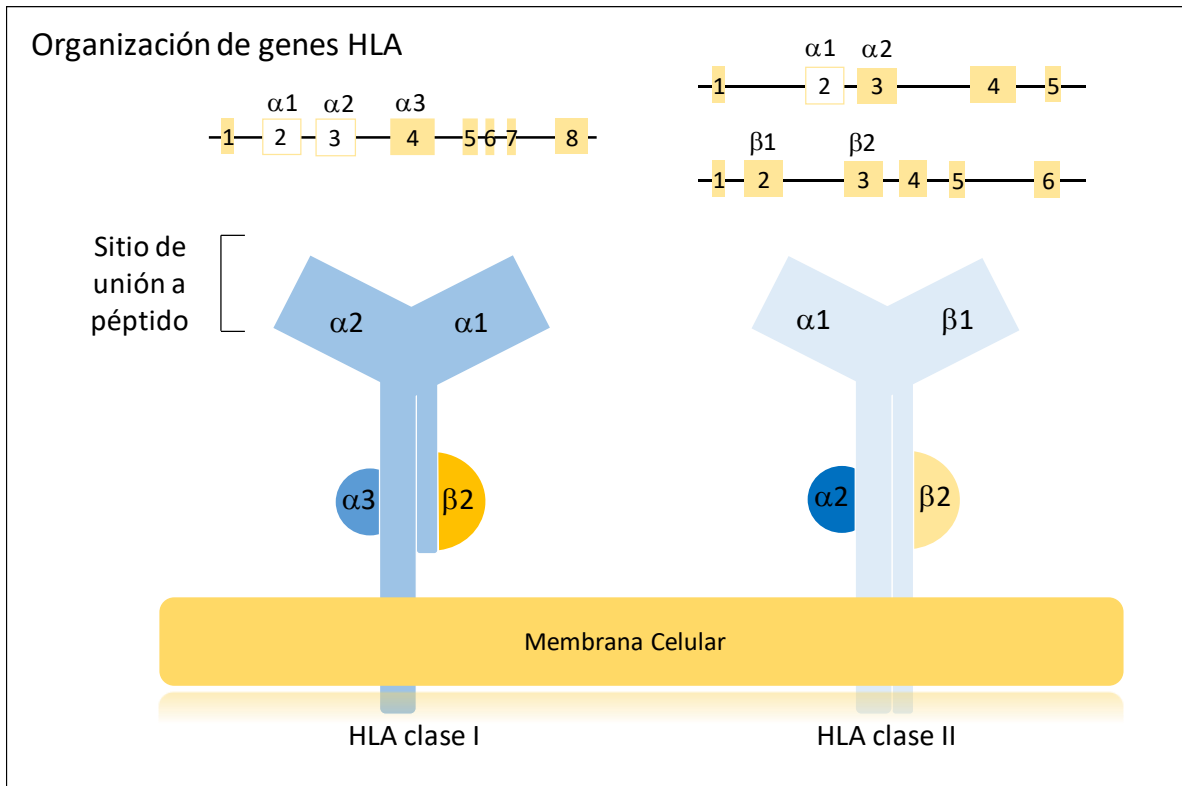


Figura 4. Genes y moléculas HLA de clase I y clase II

En el esquema de la parte superior los cuadrados representan los exones y las líneas los intrones de los genes del sistema HLA. Sobre los cuadrados se indican los dominios de las moléculas HLA codificados por los exones; los cuadrados en blanco destacan los exones que contienen la mayor parte de los polimorfismos.

Material y métodos

Variantes alélicas de los genes *HLA-A*, *-B* y *-C* asociadas a RCA por LTG

Para precisar cuáles variantes alélicas del sistema HLA están asociadas a RCA por LTG hicimos una búsqueda y selección de las publicaciones sobre este tema.

Entre las variantes alélicas y haplotipos HLA asociados a RCA por LTG en diferentes grupos étnicos seleccionamos los que han sido encontrados en mestizos mexicanos. Para el análisis de estas variantes, descargamos sus secuencias de la base de datos IMGT/HLA especializada en el sistema HLA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/nucleotide.html>).

Segmentos de los genes *HLA-A*, *-B* y *-C* que contienen las secuencias de las variantes alélicas relevantes

Los exones 2 y 3 de los genes *HLA-A*, *-B* y *-C* contienen las regiones más polimórficas y los estudios farmacogenéticos asociadas al desarrollo de RCA por FAE (Fricke-Galindo et al. 2015) se han centrado en estos segmentos para identificar las variantes alélicas. De la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) descargamos las secuencias de los exones 2 y 3 y las utilizamos para seleccionar las parejas de oligonucleótidos adecuadas para generar los amplicones respectivos.

Oligonucleótidos seleccionados para generar los amplicones de los genes *HLA-A*, *-B* y *-C*

Como los genes *HLA-A*, *-B* y *-C* tienen un alto grado de homología, para amplificar y secuenciar los segmentos de cada gen que incluyan las variantes alélicas de interés delimitamos las secuencias mínimas de cada segmento y buscamos parejas de oligonucleótidos con las características necesarias para generar y secuenciar los amplicones de cada gen.

Seleccionemos parejas de oligonucleótidos de Carter et al. (1999) y determinamos su temperatura de *annealing*, contenido de GC y las validamos in

vitro con el programa OligoAnalyzer IDT Technologies (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para asegurar que sus características no incluyen la formación de estructuras secundarias de tallo-asa, homodímeros y heterodímeros. Determinamos también la especificidad de las parejas de oligonucleótidos seleccionadas con el programa de alineación de secuencias BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Adquirimos los oligonucleótidos de la compañía T4 Oligo (Irapuato, México) y preparamos soluciones madre (100 μ M) de cada uno por disolución en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 (TE). A partir de las soluciones madre preparamos alícuotas de cada oligonucleótido en concentración 10 μ M, que almacenamos a -20°C hasta antes de usarlas.

Montaje y optimización de las mezclas de PCR para generar los amplicones HLA-A, -B y -C

Exploramos las condiciones de PCR para maximizar la producción de los amplicones HLA-A (985 pb), -B (943 pb) y -C (919 pb) puros. En mezclas de PCR (25 μ L) con 40 ng de DNA genómico de un sujeto humano no susceptible a RCA por LTG exploramos los efectos de un gradiente de concentración de $MgCl_2$ y de un gradiente de temperatura de annealing sobre el rendimiento y la pureza de los tres amplicones.

Para generar el amplicón HLA-A probamos concentraciones de $MgCl_2$ de 1.5 a 4.5 mM y annealing de 62.6 a 65.9 °C, con 40 ciclos de amplificación, mientras que para el amplicón HLA-B probamos concentraciones de $MgCl_2$ de 3.0 a 4.5 mM y annealing de 65.9 a 68.3 °C, con 30 ciclos de amplificación y, finalmente, para el amplicón HLA-C probamos concentraciones de $MgCl_2$ de 3.0 a 4.5 mM y annealing de 62.6 a 68.3 °C, con 30 ciclos de amplificación.

Determinamos el tamaño e integridad de los productos de PCR por electroforesis en geles de TAE agarosa al 2% (Brody and Kern 2004) corridos en buffer TAE (Tris base 10 mM, ácido acético glacial 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8.5) 1 a 90 V por 90 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/mL) por 30 min, transiluminados con luz ultravioleta y las bandas fluorescentes registradas en

el fotodocumentador Gel Doc XR+ (Bio-Rad, Carlsbad, EE UU). Cuantificamos la intensidad de la fluorescencia de las bandas principales y secundarias en píxeles con el software Image Lab y graficamos la intensidad relativa de cada banda obtenida con el cociente de su intensidad absoluta dividido entre la intensidad absoluta de la banda más intensa.

Las tablas 2 y 3 muestran las condiciones empleadas para obtener amplicones puros en cantidad suficiente para la secuenciación.

Purificación y cuantificación de los amplicones

Para llevar a cabo la secuenciación, los amplicones deben estar libres de contaminantes como restos de oligos, dNTPs, enzimas y demás compuestos usados durante la PCR.

Para purificar los productos de las mezclas de PCR de 25 μ L, después de haber usado 6 μ L para el análisis electroforético empleamos el volumen restante (19 μ L, en tubos Eppendorf de 1.5 mL). A cada tubo añadimos 0.1 volúmenes (1.9 μ L) de acetato de sodio 3 M y tres volúmenes (57 μ L) de etanol grado biología molecular frío. El contenido fue mezclado e incubado 3 h a -20°C , centrifugado a 13,000 rpm en una microcentrífuga Sorvall Fresco (16,060 $\times g$) por 15 min a 4°C y el sobrenadante fue descartado por decantación. Las pastillas de DNA fueron lavadas con 700 μ L de etanol frío al 70% por agitación con vórtex, centrifugadas nuevamente y los sobrenadantes descartados por decantación. Las muestras se dejaron secar con la tapa abierta en un termoblock (Accublock, Labnet International Inc.) a 65°C por 20 min. Una vez evaporado el etanol, a cada muestra añadimos 30 μ L de agua MilliQ y las dejamos hidratarse toda la noche a temperatura ambiente.

Determinamos la cantidad y pureza del DNA de cada amplicón por la absorbencia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) y la relación A_{260}/A_{280} en un espectrofotómetro con lector de microplacas (Epoch, BioTek).

Clonación del amplicón HLA-B

Como la producción del amplicón HLA-B (943) fue insuficiente para secuenciarlo, decidimos clonarlo para usarlo como molde en la PCR y contar con él como control positivo en experimentos futuros.

Tabla 2. Composición de las mezclas de PCR (25 μ L) optimizadas para los amplicones HLA-A, -B y -C

Componentes	μ l/mezcla		
	HLA-A	HLA-B	HLA-C
Agua MilliQ estéril	18.6	17.7	17.95
Buffer PCR 10x (MgCl ₂ 15 mM)	2.5	2.5	2.5
dNTPs (10 mM c/u)	0.5	0.5	0.5
Parejas de oligonucleótidos específicos (10 μ M c/u)	0.4	0.8	0.8
Taq Blue (1 U/ μ L)	0.5	0.5	0.5
MgCl ₂ (50 mM)	0.5	1.0	0.75
DNA genómico (20 ng/ μ L)	2.0	2.0	2.0

Tabla 3. Programas del termociclador optimizados para los amplicones HLA-A, -B y -C

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)			Tiempo	Ciclos
	HLA-A	HLA-B	HLA-C		
Desnaturalización inicial	94.0	94.0	94.0	5 min	1
Desnaturalización	94.0	94.0	94.0	30 s	40/30/30
Annealing	63.3	65.9	68.3	30 s	
Extensión	72.0	72.0	72.0	1 min	
Extensión final	72.0	72.0	72.0	10 min	1
Conservación	25.0	25.0	25.0	∞	1

Insertamos el amplicón en pGEM T-Easy en una mezcla de ligación con la que transformamos *Escherichia coli* TOP10 por choque térmico.

Las mezclas de transformación fueron incubadas en agar selectivo (LB-Cb-IPTG-XGal) toda la noche a 37°C. Seleccionamos cepas Amp^R Lac⁻ (colonias blancas) mediante dos pases sucesivos de colonias aisladas en agar selectivo.

Para verificar si las clonas transformantes elegidas portan plásmidos recombinantes con el inserto deseado extrajimos y purificamos el DNA plasmídico para amplificar el inserto mediante PCR y liberarlo por restricción con EcoRI.

Analizamos los productos de amplificación por electroforesis en geles SB-agarosa al 2% calibrados con una escalera de 1200 pb (Seegene), teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ mL).

Secuenciación de los amplicones

Los productos de PCR para secuenciación en el LANBAMA con el método de desoxinucleótidos marcados deben ser purificados, tener una concentración de 15 ng/µL, valores de la razón A_{260}/A_{280} en el rango 1.6-1.9 y acompañarse con soluciones de los oligonucleótidos forward y reverse por separado en concentración 5 µM en tubos de 1.5 mL para cada amplicón. El DNA de pAP100 que contiene el inserto del amplicón HLA-B fue secuenciado en el LANBAMA con los oligos M13 forward y reverse comerciales.

Secuencia de los amplicones e identificación de las variantes alélicas

Los resultados de la secuenciación de cada amplicón entregados por el LANBAMA incluyen dos archivos electrónicos: uno con las secuencias forward y reverse y otro con el cromatograma (formato .ABI) que registra los picos cuya área corresponde al contenido de cada base.

A partir de las secuencias obtenidas con cada oligonucleótido reverse generamos las secuencias reversas complementarias ('forward') con la aplicación Reverse Complement (www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html).

Con la aplicación MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) determinamos la identidad de los amplicones HLA-A, HLA-B y HLA-C mediante

alineación de las secuencias forward y reversas complementarias con las de los segmentos correspondientes en los genes de referencia (*HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*) Identificamos las variantes alélicas correspondientes a estos amplicones con BLAST en la base de datos del sitio IMGT/HLA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/nucleotide.html>) que contiene las secuencias de variantes alélicas HLA conocidas.

Resultados

Variantes alélicas asociadas a RCA por LTG

Para identificar las variantes alélicas *HLA* asociadas a RCA por LTG llevamos a cabo la búsqueda y selección de las publicaciones pertinentes.

Hasta el momento de la búsqueda habían sido descritas 14 variantes alélicas y dos haplotipos de los loci *HLA* asociados a RCA por LTG en diferentes grupos étnicos (Tabla 4), entre los cuales cinco variantes alélicas y un haplotipo con dos variantes alélicas corresponden a mestizos mexicanos (Tabla 5).

Delimitación de los segmentos de interés de los genes *HLA-A*, *-B* y *-C* y sus respectivos amplicones

A partir del conocimiento de las secuencias de las variantes alélicas asociadas a RCA por LTG en mestizos mexicanos delimitamos los segmentos genómicos que las contienen (Tabla 6) y seleccionamos las parejas de oligonucleótidos que generen los amplicones HLA-A (985 pb), HLA-B (943 pb) y HLA-C (919 pb). La Tabla 7 muestra las secuencias de las parejas de oligonucleótidos seleccionados y la Fig. 5 es un diagrama de los tres amplicones.

Condiciones de PCR para generar los amplicones

En mezclas de PCR de 25 μ L determinamos las siguientes condiciones para los rendimientos máximos de bandas puras de cada amplicón: HLA-A, MgCl₂ 2.5 mM, annealing a 63.3 °C; HLA-B, MgCl₂ 3.5 mM, annealing a 65.9 °C; HLA-C, MgCl₂ 3.0 mM, annealing a 68.3 °C.

Las figuras 6, 7 y 8 muestran los electroferogramas y las intensidades relativas de las bandas de los amplicones HLA-A, HLA-B y HLA-C generados en las mezclas de PCR respectivas. La figura 9 es un electroferograma con los tres amplicones generados en condiciones óptimas.

Tabla 4. Alelos y haplotipos *HLA* de clase I asociados a reacciones cutáneas adversas a lamotrigina en diversos grupos étnicos

Alelos/Haplotipos	RCAM	Etnia	HLA+/total	Referencia
<i>HLA-A*02:07:01</i>	EMP/SSJ	Asiáticos	5/15	Koomdee et al. (2017)
<i>HLA-A*23:01:01</i>	SSJ	Mestizos mexicanos	1/4	Fricke-Galindo et al. (2014)
<i>HLA-A*24:02</i>	RCAM	Noruegos	10/28	Shirzadi et al. (2015)
	EMP	Coreanos	15/21	Moon et al. (2015)
<i>HLA-A*30:01</i>	EMP	Chinos Han	6/86	Li et al. (2013)
<i>HLA-A*33:03</i>	EMP	Tailandeses	3/86	Li et al. (2013)
<i>HLA-A*68:01</i>	RCAM	Europeos	4/44	Kazeem et al. (2009)
<i>HLA-B*13:02</i>	EMP	Chinos Han	6/86	Li et al. (2013)
<i>HLA-B*15:02:01</i>	EMP/SSJ	Asiáticos	6/15	Koomdee et al. (2017)
<i>HLA-B*35:01:01</i>	EMP	Mestizos mexicanos	6/10	Fricke-Galindo et al. (2014)
<i>HLA-B*38:01:01</i>	SSJ/NET	Blancos	3/3	Ramírez et al. (2017)
<i>HLA-B*40:02:01</i>	SSJ	Mestizos mexicanos	2/4	Fricke-Galindo et al. (2014)
<i>HLA-B*44:03:01</i>	EMP	Asiáticos	3/10	Koomdee et al. (2017)
<i>HLA-B*44:03</i>	SSJ/NET	Coreanos	3/5	Park et al. (2015)
<i>HLA-B*57:01:01</i>	SSJ	Mestizos mexicanos	1/2	Fricke-Galindo et al. (2014)
<i>HLA-B*58:01:01</i>	SSJ	Mestizos mexicanos	1/2	Fricke-Galindo et al. (2014)
<i>HLA-B*58:01</i>	RCAM	Población mixta	3/44	Kazeem et al. (2009)
<i>HLA-A*24:02/C*01:02</i>	EMP	Coreanos	10/21	Moon et al. (2015)
<i>HLA-A*02:01:01/B*35:01:01/C*04:01:01</i>	EMP	Mestizos mexicanos	5/10	Fricke-Galindo et al. (2014)

RCAM, reacciones cutáneas adversas a medicamentos. HLA+/total, número de sujetos con alelo *HLA* positivo en el número total de sujetos incluidos. EMP, exantema maculopapular. SSJ, síndrome de Stevens-Johnson. NET, necrólisis epidérmica tóxica.

Tabla 5. Alelos y haplotipos *HLA* de clase I asociados a reacciones cutáneas adversas por lamotrigina en mestizos mexicanos (Fricke-Galindo et al. 2014)

Haplotipo
<i>HLA-A*02:01:01/B*35:01:01/C*04:01:01</i>
Alelos
<i>HLA-A*23:01:01</i>
<i>HLA-B*35:01:01</i>
<i>HLA-B*40:02:01</i>
<i>HLA-B*57:01:01</i>
<i>HLA-B*58:01:01</i>

Tabla 6. Localización y extensión de los segmentos del cromosoma 6 que contienen las secuencias de las variantes alélicas de interés

Segmento	Variantes que incluye	Nucleótido inicial - final	Longitud
<i>HLA-A</i>	<i>HLA-A*02:01:01</i>	5181 (intrón 1) - 6166 (intrón 3)	985 pb
	<i>HLA-A*23:01:01</i>		
<i>HLA-B</i>	<i>HLA-B*35:01:01</i>	5161 (intrón 1) - 6104 (intrón 3)	943 pb
	<i>HLA-B*40:02:01</i>		
	<i>HLA-B*57:01:01</i>		
	<i>HLA-B*58:01:01</i>		
<i>HLA-C</i>	<i>HLA-C*04:01:01</i>	5174 (intrón 1) – 6093 (intrón 3)	919 pb

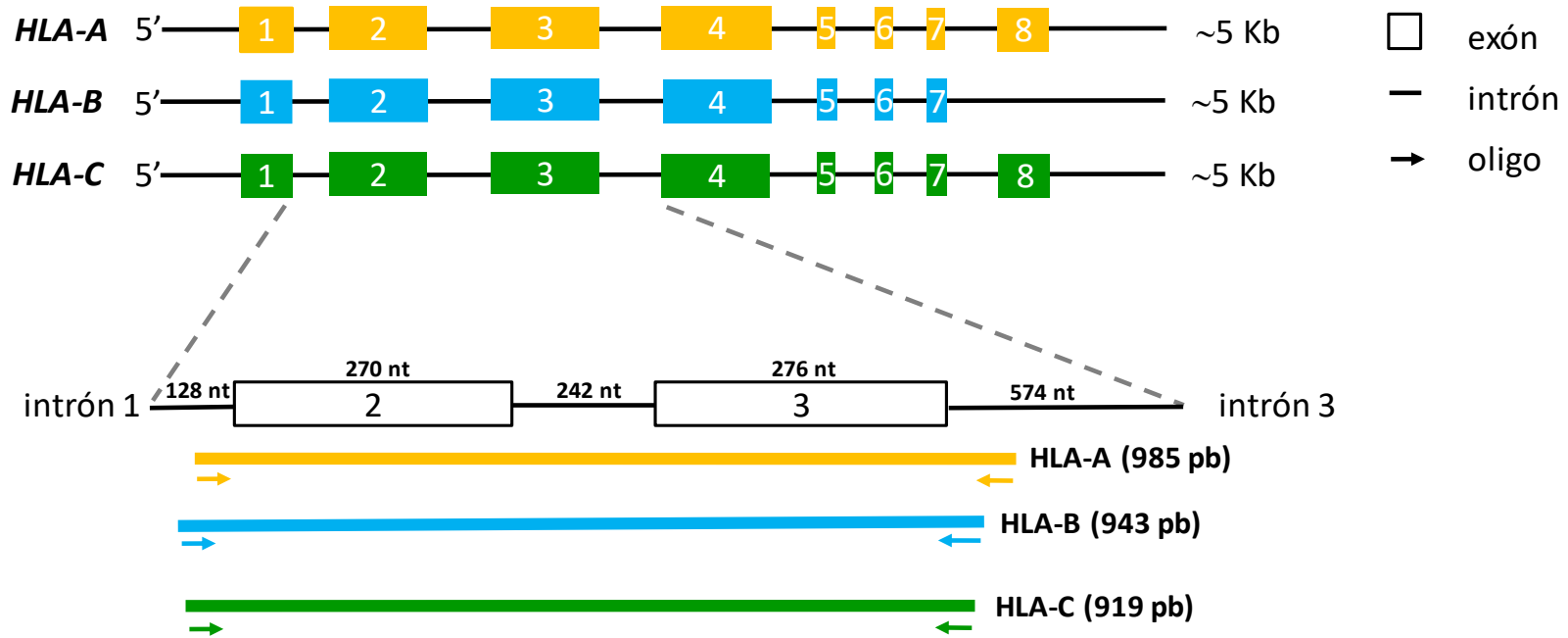


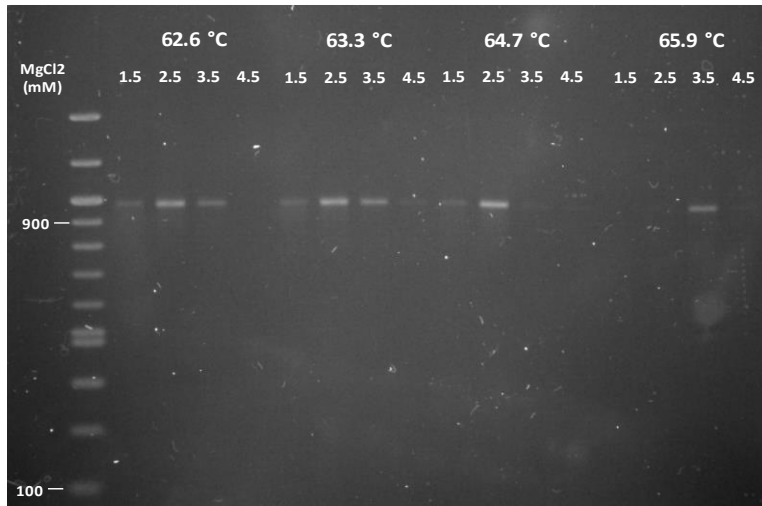
Figura 5. Diagrama de los amplicones de los genes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* generados en este trabajo

Las tres parejas de oligonucleótidos fueron seleccionadas para generar los amplicones específicos de los genes *HLA-A* (985 pb), *HLA-B* (943 pb) y *HLA-C* (919 pb).

Tabla 7. Oligonucleótidos seleccionados para generar los tres amplicones de interés (Carter et al. 1999)

Amplicón (pb)	Oligonucleótidos		Tm (°C)
HLA-A (985)	Forward	GAAACCGCCTCTGCGGGGAGAAGCAA	66.7
	Reverse	TGTTGGTCCCAATTGTCTCCCCTC	60.9
HLA-B (943)	Forward	GGGAGGAGCGAGGGGACCCAG	68.0
	Reverse	GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT	67.2
HLA-C (919)	Forward	AGCGAGGGGCCCGCCCGGCGA	75.8
	Reverse	GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	64.9

A



B

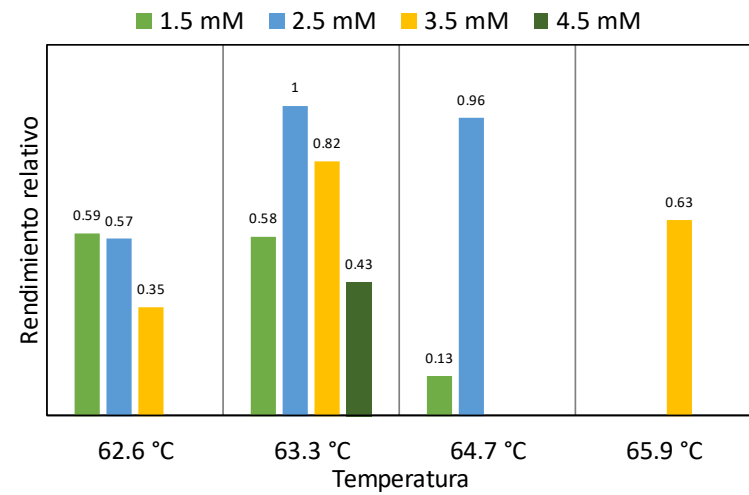
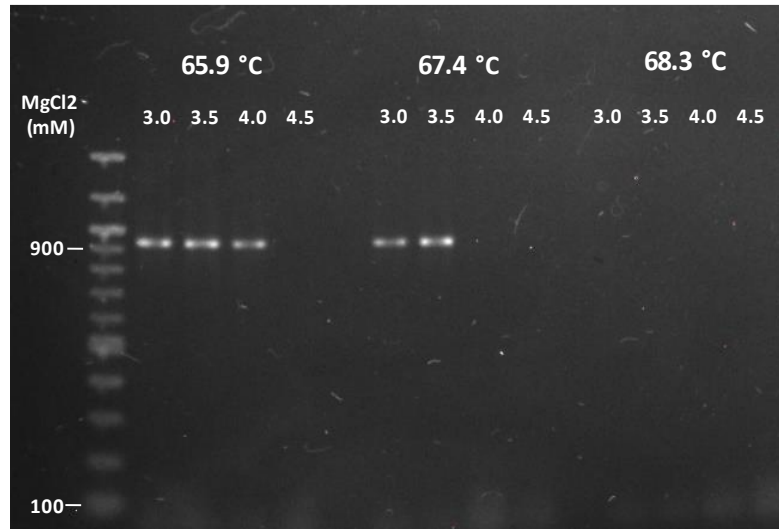


Figura 6. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas en mezclas de PCR para el amplicón HLA-A con MgCl₂ 1.5-4.5 mM y annealing de 62.6 a 65.9 °C

(A) Gel TAE-agarosa al 1.5%. Banda HLA-A (985 pb) en mezclas de PCR amplificadas por 40 ciclos. (B) Gráfica del rendimiento relativo de las bandas del amplicón HLA-A respecto al máximo, normalizado como 1.00.

A



B

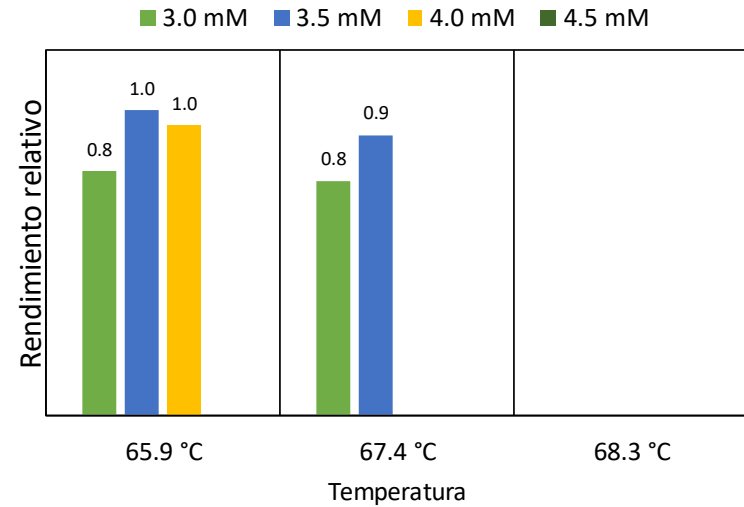
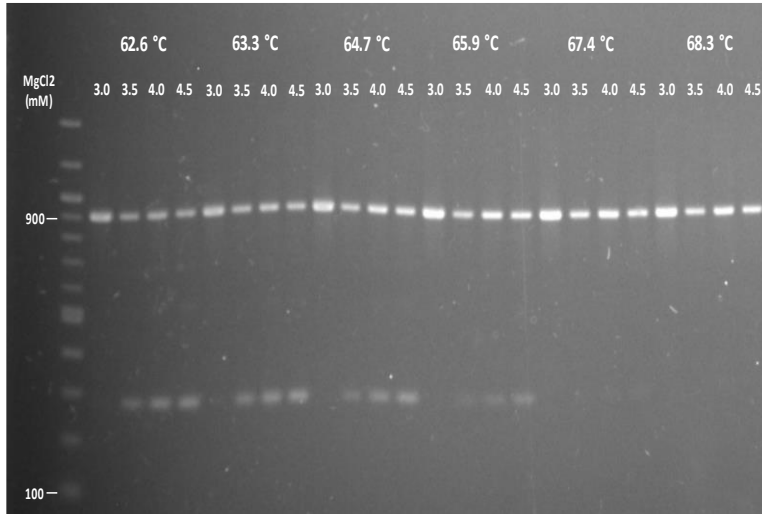


Figura 7. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas en mezclas de PCR para el amplicón HLA-B con MgCl₂ 3-4.5 mM y annealing de 65.9 a 68.3 °C

(A) Gel TAE-agarosa al 1.5%. Banda HLA-B (943 pb) en mezclas de PCR amplificadas por 30 ciclos. (B) Gráfica del rendimiento relativo de las bandas del amplicón HLA-B respecto al máximo, normalizado como 1.00.

A



B

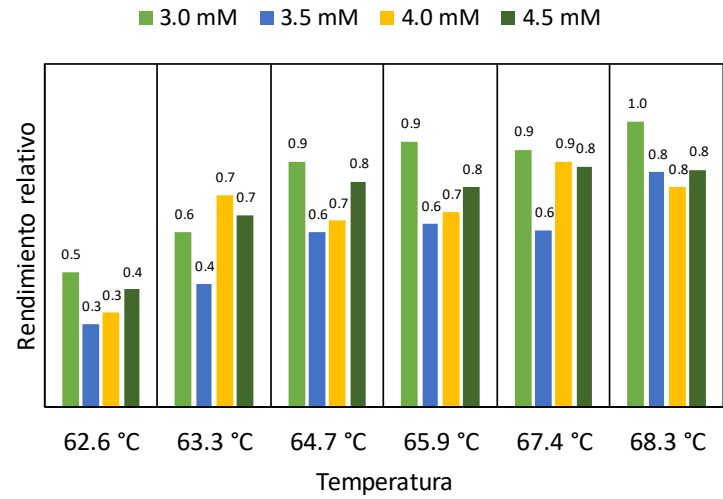


Figura 8. Electroferograma e intensidades relativas de las bandas observadas en mezclas de PCR para el amplicón HLA-C con MgCl₂ 3-4.5 mM y annealing de 62.6 a 68.3 °C

(A) Gel TAE-agarosa al 1.5%. Banda HLA-C (919 pb) en mezclas de PCR amplificadas por 30 ciclos. (B) Gráfica del rendimiento relativo de las bandas del amplicón HLA-C respecto al máximo, normalizado como 1.00.

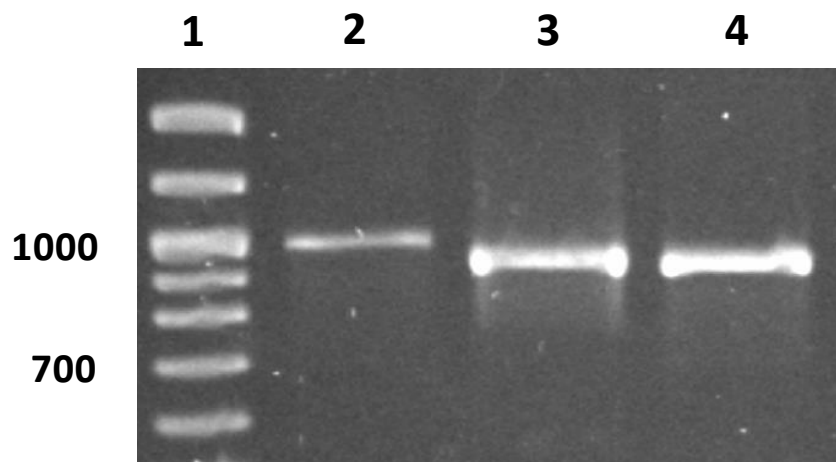


Figura 9. Electroferograma de mezclas de PCR para los amplicones HLA-A, -B y -C en condiciones óptimas

Gel SB-agarosa al 2.0%. Carril 1, Escalera de 1200 pb. Carril 2, amplicón HLA-A (985 pb). Carril 3, amplicón HLA-B (943 pb). Carril 4, amplicón HLA-C (919 pb).

Clonación y secuenciación del amplicón HLA-B

Como la PCR con DNA genómico humano no generó el amplicón HLA-B en cantidad suficiente para secuenciarlo, decidimos clonarlo para poder amplificarlo, secuenciarlo y usarlo como control positivo en experimentos futuros.

Para la clonación empleamos una mezcla de ligación con el amplicón HLA-B y el vector pGEM que usamos para transformar un cultivo de *E. coli* TOP10. De la clona de *E. coli* seleccionada, denominada AP100 (Lac⁻, Amp^R), aislamos el plásmido pAP100 cuyo inserto es el amplicón HLA-B, a partir del cual generamos cantidad suficiente del amplicón para secuenciarlo (Fig. 10).

Variantes alélicas identificadas en los amplicones

Los nombres y grados de identidad de las variantes alélicas reconocidas en la base de datos IMTG/HLA con las secuencias de los amplicones HLA del sujeto sano incluido en este estudio son: *HLA-A*24:470*, 99.8% (Fig. 11); *HLA-B*07:359*, 98.4% (Fig. 12); *HLA-C*04:199*, 98.8% (Fig. 13).

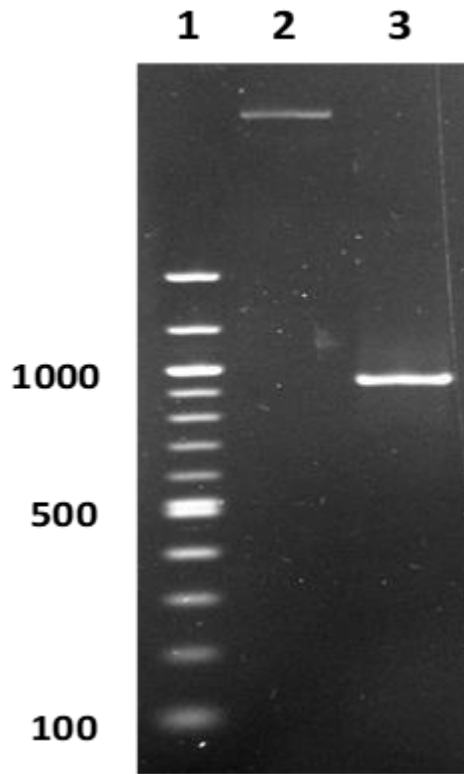


Figura 10. Electroferograma del amplicón HLA-B generado a partir del plásmido pAP100

Gel TAE-agarosa al 1.5%. Carril 1, Escalera de 1200 pb. Carril 2, pAP100. Carril 3, mezcla de PCR para el amplicón HLA-B (943 pb).

HLA-A*24:470	158	CGCCGGGAGGAGGGTTCGGGCGGGTCTCAGCCACTCCTCG-TCCCCAGGCTCCCACTCCAT	216
Amplicón A	1	CGCCGGGAGGAGGGTTCGGGCGGGTCTCAGCCACTCCTCGCTCCCACTCCCACTCCAT	60
HLA-A*24:470	217	GAGGTATTTCACACATCCGTGTCCTCCGGCCCGGCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCGT	276
Amplicón A	61	GAGGTATTTCACACATCCGTGTCCTCCGGCCCGGCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCGT	120
HLA-A*24:470	277	GGGTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCGAGCCAGAGGAT	336
Amplicón A	121	GGGTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCGAGCCAGAGGAT	180
HLA-A*24:470	337	GGAGCCGCGGGCGCGGTGGATAGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACGAGGAGACAGG	396
Amplicón A	181	GGAGCCGCGGGCGCGGTGGATAGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACGAGGAGACAGG	240
HLA-A*24:470	397	GAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTGACCGAGAGAACCTGCGGATCGCGCTCCGCTACTA	456
Amplicón A	241	GAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTGACCGAGAGAACCTGCGGATCGCGCTCCGCTACTA	300
HLA-A*24:470	457	CAACCAGAGCGAGGCCGGTGTAGTGACCCCGGCCGGGGCGCAGGTACGACCCCTCATCC	516
Amplicón A	301	CAACCAGAGCGAGGCCGGTGTAGTGACCCCGGCCGGGGCGCAGGTACGACCCCTCATCC	360
HLA-A*24:470	517	CCCACGGACGGCCGGGTTCGCCACAGTCTCCGGGTCGAGATCCACCCGAAGCCGCGG	576
Amplicón A	361	CCCACGGACGGCCGGGTTCGCCACAGTCTCCGGGTCGAGATCCACCCGAAGCCGCGG	420
HLA-A*24:470	577	GACCCCGAGACCCCTTGCCCGGGAGAGGCCAGGCGCCTTAACCCGGTTTCATTTTCAGT	636
Amplicón A	421	GACCCCGAGACCCCTTGCCCGGGAGAGGCCAGGCGCCTTAACCCGGTTTCATTTTCAGT	480
HLA-A*24:470	637	TTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTTGGTCGGGGCCGGGCGGGGCTCGGGGACTGGGCTGA	696
Amplicón A	481	TTAGGCCAAAAATCCCCCGGGTTGGTCGGGGCCGGGCGGGGCTCGGGGACTGGGCTGA	540
HLA-A*24:470	697	CCGCGGGTTCGGGGCCAGGTTCACACCCCTCCAGATGATGTTGGCTGCGACGTGGGGT	756
Amplicón A	541	CCGCGGGTTCGGGGCCAGGTTCACACCCCTCCAGATGATGTTGGCTGCGACGTGGGGT	600
HLA-A*24:470	757	CGGACGGGCGCTTCTCCGCGGGTACCACCAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCG	816
Amplicón A	601	CGGACGGGCGCTTCTCCGCGGGTACCACCAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCG	660
HLA-A*24:470	817	CCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGACCGCGGGACATGGCGGCTCAGATCACCAAGC	876
Amplicón A	661	CCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGACCGCGGGACATGGCGGCTCAGATCACCAAGC	720
HLA-A*24:470	877	GCAAGTGGGAGGCGGCCATGTGGCGGAGCAGCAGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCG	936
Amplicón A	721	GCAAGTGGGAGGCGGCCATGTGGCGGAGCAGCAGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCG	780
HLA-A*24:470	937	TGGACGGGCTCCGACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGGTACCA	996
Amplicón A	781	TGGACGGGCTCCGACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGGTACCA	840
HLA-A*24:470	997	GGGGCCACGGGG 1008	
Amplicón A	841	GGGGCCACGGGG 852	

Figura 11. Alineación de la secuencia genómica de la variante alélica *HLA-A*24:470* con la del amplicón *HLA-A*

La secuencia obtenida a partir de DNA de un control sano tiene 99.8% de identidad con la variante alélica *HLA-A*24:470*. Las diferencias en las secuencias están resaltadas en color amarillo.

HLA-B*07:359	392	GGGAGGAGCGAGGGGACCCAGGCGGGGGCGCAGGACCTGAGGAGCCGCGCCGGGAGGAG	451
Amplicón B	1	GGGAGGAGCGAGGGGACCCAGGCGGGGGCGCAGGACCTGAGGAGCCGCGCCGGGAGGAG	60
HLA-B*07:359	452	GGTCGGGCGGGTCTCAGCCCTCCTCACCCCCAGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTAC	511
Amplicón B	61	GGTCGGGCGGGTCTCAGCCCTCCTCACCCCCAGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTAC	120
HLA-B*07:359	512	ACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCCGGGGAGCCCGCTTCATCTCAGTGGGCTACGTGGAC	571
Amplicón B	121	ACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCCGGGGAGCCCGCTTCATCTCAGTGGGCTACGTGGAC	180
HLA-B*07:359	572	GACACCCAGTTTCGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCCGAGTCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCG	631
Amplicón B	181	GACACCCAGTTTCGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCCGAGTCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCG	240
HLA-B*07:359	632	CCGTGGATAGAGCAGGAGGGGGCCGGAGTATGGGACCGGAACACACAGATCTACAAGGCC	691
Amplicón B	241	CCGTGGATAGAGCAGGAGGGGGCCGGAGTATGGGACCGGAACACACAGATCTACAAGGCC	300
HLA-B*07:359	692	CAGGCACAGACTGACCGAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGGGCTACTACAACCAGAGCGAG	751
Amplicón B	301	CAGGCACAGACTGACCGAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGGGCTACTACAACCAGAGCGAG	360
HLA-B*07:359	752	GCCGGTGAGTGACCCCGGCCCGGGGCGCAGGTCACGACTCCCCATCCCCACGTACGGCC	811
Amplicón B	361	GCCGGTGAGTGACCCCGGCCCGGGGCGCAGGTCACGACTCCCCATCCCCACGTACGGCC	420
HLA-B*07:359	812	CGGGTCGCCCCGAGTCTCCGGGTCGAGATCCGCCTCCCTGAGGCCGCGGGACCCGCCCA	871
Amplicón B	421	CGGGTCGCCCCGAGTCTCCGGGTCGAGATCCGCCTCCCTGAGGCCGCGGGACCCGCCCA	480
HLA-B*07:359	872	GACCTCGACCGGCGAGAGCCCGAGCGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTGAGGCCA	931
Amplicón B	481	GACCTCGACCGGCGAGAGCCCGAGCGCGTTTACCCGGTTTCATTTTCAGTTGAGGCCA	540
HLA-B*07:359	932	AAATCCCCCGGGTTGGTCGGGGCGGGGCGGGGCTCGGGGACGGGGCTGACCGCGGGGC	991
Amplicón B	541	AAATCCCCCGGGTTGGTCGGGGCGGGGCGGGGCTCGGGGAC-GGGCTGACCGCGGGGC	599
HLA-B*07:359	992	CGGGGCCAGGGTCTCACATCATCCAGAGGATGTACGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGC	1051
Amplicón B	600	CGGGGCCAGGGTCTCACATCATCCAGAGGATGTATGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGC	659
HLA-B*07:359	1052	GCCTCCTCCGCGGGTATGACCAGGACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACG	1111
Amplicón B	660	GCCTCCTCCGCGGGCATGACCAGTCCGCATACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACG	719
HLA-B*07:359	1112	AGGACCTGAGCTCCTGGACCGCGGGGACACCCCGGGCTCAGATACCCAGCGCAAGTGGG	1171
Amplicón B	720	AGGACCTGAGCTCCTGGACCGCGGGGACACCCCGGGCTCAGATACCCAGCGCAAGTGGG	779
HLA-B*07:359	1172	AGGCGGCCCGTGTGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCCTGTGCGTGGAGTCCG	1231
Amplicón B	780	AGGCGGCCCGTGTGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCCTGTGCGTGGAGTGGGA	839
HLA-B*07:359	1232	TCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGGGGTACCAGGGGCAGTG	1291
Amplicón B	840	TACGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGGGGTACCAGGGGCAGTG	899
HLA-B*07:359	1292	GGGAGCCTTCCCCATCT-CCTATAGGTCGCCGGGGATGGCCTCC	1334
Amplicón B	900	GGGAGCCTTCCCCATGTGCCTATAGGTCGCCGGGGATGGCCTCC	943

Figura 12. Alineación de la secuencia genómica de la variante alélica *HLA-B*07:359* con la del amplicón HLA-B

La secuencia obtenida a partir de DNA de un control sano tiene 98.4% de identidad con la variante alélica *HLA-B*07:359*. Las diferencias en las secuencias están resaltadas en color amarillo.

Discusión

Hemos desarrollado un método rápido y confiable para amplificar y secuenciar los fragmentos genómicos de los genes *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C* altamente polimórficos que incluyen las siete variantes alélicas clínicamente relevantes que están asociadas a las reacciones cutáneas adversas por LTG en mestizos mexicanos: *HLA-A*02:01:01*, *HLA-A*23:01:01*, *HLA-B*40:02:01*, *HLA-B*35:01:01*, *HLA-B*57:01:01*, *HLA-B*58:01:01* y *HLA-C*04:01:01* (Fricke-Galindo et al. 2014).

Identificamos las variantes alélicas de los genes *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C* involucradas en las RCA por FAE mediante una búsqueda bibliográfica. Descargamos las secuencias de los genes de referencia (*HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*) de la base de datos NCBI para delimitar los segmentos genómicos con las secuencias de las variantes alélicas HLA de interés y seleccionamos las parejas de oligonucleótidos descritas por Carter et al. (1999) para generar los amplicones de los genes.

Con la aplicación OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>) validamos los amplicones y con Primer-BLAST-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) verificamos in silico la especificidad de cada pareja de oligonucleótidos para generar los amplicones específicos deseados.

Para generar los amplicones *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C* puros en cantidad suficiente para la secuenciación exploramos las siguientes variables en las mezclas de PCR que usaron como molde DNA genómico de un sujeto sano: concentración de $MgCl_2$ en el rango usual para la Taq polimerasa (1.5-4.5 mM), temperaturas de annealing, y cantidad de DNA.

El ajuste de la concentración de $MgCl_2$ y de la temperatura de annealing permitió obtener amplicones *HLA-B* y *HLA-C* puros (Fig. 7 y 8). Para generar el amplicón *HLA-A* puro (Fig. 6) tuvimos que aumentar el número de ciclos y ajustar la concentración de oligonucleótidos.

Una vez optimizadas las condiciones de los ensayos de PCR para los amplicones HLA-A, HLA-B y HLA-C, los purificamos por precipitación con etanol en presencia de acetato de sodio.

Solamente los amplicones HLA-A y HLA-C tuvieron la masa y pureza requerida para la secuenciación (≥ 100 ng, A_{260}/A_{280} 1.7-2.0). Para obtener suficiente cantidad del amplicón HLA-B lo clonamos en *E. coli* TOP10 y purificamos pAP100, el plásmido de la construcción resultante, que al ser usado como molde generó DNA del inserto suficiente para la secuenciación.

La menor eficiencia para la generación del amplicón HLA-B con DNA genómico puede deberse a discordancia de uno o los dos oligonucleótidos de la pareja con la secuencia de los extremos del segmento genómico blanco. El aumento de la eficiencia con el inserto probablemente obedece a que en éste los extremos del inserto están dados por los oligonucleótidos usados para generarlo. Para montar los ensayos rutinarios deben probarse muestras de DNA genómico de varios sujetos y eliminar la necesidad de clonación para obtener la secuencia del amplicón HLA-B.

Con el uso de BLAST de la base datos IMGT/HLA identificamos las variantes *HLA-A*24:470*, *HLA-B*07:359* y *HLA-C*04:199* en el sujeto sano incluido en este estudio preliminar que, como esperábamos, no corresponden a las que están asociadas a RCA por LTG en mestizos mexicanos.

Este método de genotipificación basado en la evidencia directa que representan las secuencias nucleotídicas permitirá identificar las variantes asociadas a RCA por LTG en mestizos mexicanos y cualesquiera otras que estén registradas en la base IMGT/HLA y servirá para identificar a los pacientes epilépticos candidatos a ser tratados con LTG que sean potencialmente tolerantes y susceptibles al medicamento.

Una vez eliminada la necesidad de clonar el amplicón HLA-B, el método podrá emplearse rutinariamente para identificar a los pacientes epilépticos tolerantes a LTG, excluir del tratamiento a los que porten las variantes alélicas asociadas a RCA e incluso encontrar nuevas variantes alélicas entre los susceptibles.

Referencias

- Beattie K, Phadke G, Novakovic J (2012) Lamotrigine. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol 37:245–285. doi: 10.1016/B978-0-12-397220-0.00006-4
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x
- Brody JR, Kern SE (2004) History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Anal. Biochem.
- Cao H, Wu J, Wang Y, et al (2013) An Integrated Tool to Study MHC Region: Accurate SNV Detection and HLA Genes Typing in Human MHC Region Using Targeted High-Throughput Sequencing. PLoS One 8:. doi: 10.1371/journal.pone.0069388
- Carter AS, Cerundolo L, Bunce M, et al (1999) Nested Polymerase Chain Reaction With Sequence-Specific Primers Typing for HLA-A, -B, and -C Alleles: Detection of Microchimerism in DR-Matched Individuals. Blood 94:1471–1474
- Ebrahimi HA, Ebrahimi F (2012) The Effect of Lamotrigine on Epilepsy. J Neurol. doi: 10.1097/01.yct.0000264341.34695.e9
- Erlich H (2012) HLA DNA typing: past, present, and future. Tissue Antigens 80:1–11. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01881.x
- Fisher RS, Van Emde Boas W, Blume W, et al (2005) Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia
- Fricke-Galindo I, Jung-Cook H, LLerena A, López-López M (2015) Farmacogenética de reacciones adversas a fármacos antiepilépticos. Neurologia 33:165–176. doi: 10.1016/j.nrl.2015.03.005
- Fricke-Galindo I, Martinez-Juarez IE, Monroy-Jaramillo N, et al (2014) HLA-A*02:01:01/-B*35:01:01/-C*04:01:01 haplotype associated with lamotrigine-induced maculopapular exanthema in Mexican Mestizo patients. Pharmacogenomics 15:1881–1891. doi: 10.2217/pgs.14.135

- Goldsmith DR, Wagstaff AJ, Ibbotson T, Perry CM (2003) Lamotrigine: A review of its use in bipolar disorder. *Drugs*
- Gough SCL, Simmonds MJ (2007) The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Curr Genomics*. doi: 10.2174/138920207783591690
- Kalow W (2006) Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. *Pharmacogenomics J* 6:162–165. doi: DOI 10.1038/sj.tpj.6500361
- Kazeem GR, Cox C, Aponte J, et al (2009) High-resolution HLA genotyping and severe cutaneous adverse reactions in lamotrigine-treated patients. *Pharmacogenet Genomics* 19:661–665. doi: 10.1097/FPC.0b013e32832c347d
- Koomdee N, Pratoomwun J, Jantararoungtong T, et al (2017) Association of HLA-A and HLA-B alleles with lamotrigine-induced cutaneous adverse drug reactions in the Thai population. *Front Pharmacol*. doi: 10.3389/fphar.2017.00879
- Li LJ, Hu FY, Wu XT, et al (2013) Predictive markers for carbamazepine and lamotrigine-induced maculopapular exanthema in Han Chinese. *Epilepsy Res* 106:296–300. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2013.05.004
- López M, Dorado P, Monroy N, et al (2011) Pharmacogenetics of the antiepileptic drugs phenytoin and lamotrigine. *26:5–12*. doi: 10.1515/DMDI.2011.008
- Moon J, Park HK, Chu K, et al (2015) The HLA-A*2402/Cw*0102 haplotype is associated with lamotrigine-induced maculopapular eruption in the Korean population. *Epilepsia*. doi: 10.1111/epi.13087
- Motte J, Trevathan E, Arvidsson JF, et al (1997) Lamotrigine for generalized seizures associated with the Lennox-Gastaut syndrome. Lamictal Lennox-Gastaut Study Group. *N Engl J Med*. doi: 10.1056/NEJM199712183372504
- Park HJ, Kim SR, Leem DW, et al (2015) Clinical features of and genetic predisposition to drug-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a single Korean tertiary institution patients - Investigating the relation between the HLA-B*4403 allele and lamotrigine. *Eur J Clin Pharmacol*. doi: 10.1007/s00228-014-1764-0
- Ramírez E, Bellón T, Tong HY, et al (2017) Significant HLA class I type associations

- with aromatic antiepileptic drug (AED)-induced SJS/TEN are different from those found for the same AED-induced DRESS in the Spanish population. *Pharmacol Res* 115:168–178. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.027
- Shi YW, Min FL, Zhou D, et al (2017) HLA-A*24:02 as a common risk factor for antiepileptic drug-induced cutaneous adverse reactions. *Neurology*. doi: 10.1212/WNL.0000000000004008
- Shirzadi M, Thorstensen K, Helde G, et al (2015) Do HLA-A markers predict skin-reactions from aromatic antiepileptic drugs in a Norwegian population? A case control study. *Epilepsy Res*. doi: 10.1016/j.eplesyres.2015.09.011
- Shorvon SD (2011) The causes of epilepsy: Changing concepts of etiology of epilepsy over the past 150 years. *Epilepsia*
- Varney MD, Castley AS, Haimila K, Saavalainen P (2012) Methods for diagnostic HLA typing in disease association and drug hypersensitivity. *Methods Mol Biol* 882:27–46. doi: 10.1007/978-1-61779-842-9_3
- Warshavsky A, Eilam A, Gilad R (2016) Lamotrigine as monotherapy in clinical practice: Efficacy of various dosages in epilepsy. *Brain Behav*. doi: 10.1002/brb3.419
- WHO (1972) International drug monitoring: the role of national centres. Rep. a WHO Meet.

Artículo publicado

Peña Balderas AM, López-Revilla R (2019) Pharmacogenetics of adverse cutaneous reactions to lamotrigine. *Rev Mex Neuroci* 20(4):200-206. DOI: 10.24875/RMN.19000051

Revista Mexicana de Neurociencia



REVIEW ARTICLE

Pharmacogenetics of adverse cutaneous reactions to lamotrigine

Ana M. Peña-Balderas and Rubén López-Revilla*

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

Abstract

Cutaneous adverse drug reactions include maculopapular exanthema, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis and are a global public health problem associated with the use of antiepileptic drugs (AEDs). Lamotrigine (LTG) stands out among AEDs because it does not cause sedation and does not affect cognition. Cutaneous adverse reactions (cADRs) to LTG occur in patients carrying certain allele variants of the human leukocyte antigen (HLA) system; although infrequent, they are alarming because they put the life at risk and force discontinuation of the treatment. The fear of neurologists to cADRs to LTG decreases its prescription despite its therapeutic advantages. Here, we review the allele variants of the HLA system that have been associated with cADRs to LTG in Mexican mestizos and other ethnic groups; identification of these variants would serve to select the patients that may be treated with LTG.

Key words: Pharmacogenetics. Antiepileptic drugs. Lamotrigine. Cutaneous adverse drug reactions. Human leukocyte antigen system.

Farmacogenética de las reacciones cutáneas adversas a la lamotrigina

Resumen

Las reacciones cutáneas adversas a medicamentos incluyen el exantema maculopapular, el síndrome de Stevens-Johnson y la necrólisis epidérmica tóxica y son un problema de salud pública global asociado al uso de fármacos antiepilépticos. La lamotrigina destaca entre los fármacos antiepilépticos porque no causa sedación ni afecta la cognición. Las reacciones cutáneas adversas a lamotrigina ocurren en pacientes que portan ciertas variantes alélicas del sistema HLA; aunque infrecuentes, son alarmantes porque ponen en riesgo la vida y obligan a abandonar el tratamiento. El temor de los neurólogos a las reacciones cutáneas adversas a lamotrigina limita la prescripción del medicamento a pesar de sus ventajas terapéuticas. Aquí revisamos las variantes alélicas del sistema HLA que han sido asociadas a las reacciones cutáneas adversas a lamotrigina en mestizos mexicanos y otros grupos étnicos; la identificación de estas variantes permitiría seleccionar a los pacientes que podrían ser tratados con lamotrigina.

Palabras clave: Farmacogenética. Fármacos antiepilépticos. Lamotrigina. Reacciones cutáneas adversas a medicamentos. Sistema HLA.