

**ASPECTOS FARMACOGENETICOS DEL MTX, EN UN GRUPO DE PACIENTES COLOMBIANOS
CON ARTRITIS REUMATOIDE.**

Estudiantes:

Dra. Eugenia L. Saldarriaga C.
Trabajo investigación para optar Título de Reumatología

Dra. María José Ospina
Residente tercer año Medicina Interna

Tutores:

Dr. John Darío Londoño, MD, MSc, PhD

Dr. Ana María Santos, PhD

Asesores:

Dr. Pedro Santos MD, MSc

Dr. Ignacio Briceño, MD, PhD

Resumen

El metotrexato (MTX) como monoterapia o en combinación es el medicamento modificador de la enfermedad (FARMES) más utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR). Cerca del 40% de los pacientes presenta falla terapéutica o toxicidad; la variabilidad genética en las enzimas involucradas en la ruta metabólica del MTX podría influenciar este fenómeno. El objetivo de este estudio es determinar la presencia de polimorfismos de nucleótido simple de su sigla en inglés (SNPs) en las enzimas implicadas en el metabolismo del MTX y su relación con la respuesta terapéutica en un grupo de pacientes colombianos con diagnóstico de artritis reumatoide.

Metodología

Un total de 400 pacientes con AR según los criterios ACR/EULAR-2010, que asistieron consecutivamente a consulta entre marzo de 2015 y diciembre de 2016 fueron incluidos. La respuesta terapéutica fue evaluada por el DAS28PCR la toxicidad clínica y paraclínica fue evaluada de manera detallada. Los SNPs estudiados fueron: MTHFR C677T, A1298C, ATIC C347G, RFC1 G80A, FPGS A1994G y DHFR-CT, siendo estos los más importantes dentro de la ruta metabólica del MTX.

Resultados

El 76% fueron mujeres, la edad promedio fue $60,7 \pm 13,9$ años y la duración de enfermedad de $13,2 \pm 10,9$ años. Los SNPs de las enzimas MTHFR C677T ($p=0,05$) y A1298C ($p=0,048$) se asociaron con eficacia al MTX y DHFR ($p=0,01$) y ATIC C347T ($p=0,005$) con toxicidad clínica al medicamento. No se encontró relación entre los polimorfismos y con toxicidad hematológica, hepática o renal.

Conclusiones

En la población colombiana la presencia de SNPs en la ruta metabólica del MTX podrían establecerse como

biomarcadores de la respuesta al metotrexato en términos de eficacia MTHFR C677T y A1298C y de toxicidad DHFR y ATIC.

Palabras clave: Metotrexato, Artritis Reumatoide, Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), toxicidad, eficacia.

Abstract

Methotrexate (MTX) as monotherapy or in combination with disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) is the most widely used immunosuppressant for rheumatoid arthritis (RA). In the series reported, almost 40% of patients have therapeutic failure or toxicities documented. Genetic variability plays an important role especially in MTX metabolic pathways. Depending on the enzymes affected and the degree of genetic penetrance that not only worsen toxicities but also affects therapeutic response rates in susceptible individuals. The following report pretends to show the single nucleotide polymorphisms (SNPs) found in the enzymes involved in MTX metabolic pathways in a cohort of Colombian patients with RA; it also reports therapeutic response rates and toxicities most commonly found.

Methodology: 400 patients previously diagnosed with RA according to the ACR / EULAR 2010 criteria were recruited. Medical records and outpatient visits were registered and included since March 2015 to December 2016. Therapeutic response was evaluated using disease activity score (DAS28-CPR) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) analysis. The studied SNPs were: MTHFR C677T, A1298C, ATIC C347G, RFC1 G80A, FPGS-AG and DHFR-CT.

Results: 76% of the patients in the cohort were women, average age was $60,7 \pm 13,9$ years and duration of illness was $13,2 \pm 10,9$ years. SNPs of the MTHFR enzymes C677T ($p = 0,05$) and A1298C ($p = 0,048$) were associated with efficacy with MTX use and DHFR ($p = 0,01$) and ATIC C347 ($p = 0,005$). Hematologic, hepatic or renal toxicity was not associated with any SNPs.

Conclusions: MTX metabolic pathways were analyzed using biomarkers such as SNPs to evaluate therapeutic response rates in terms of efficacy. We report the SNPs most widely seen in a cohort of patient with RA in Colombian. MTHFR C677T and A1298C were associated to better therapeutic response and DHFR and ATIC were associated with toxicities secondary to the use of MTX. More studies should be performed to evaluate frequencies of SNPs and possible patterns of MTX toxicities and resistance to treatment.

Key words: Methotrexate, Rheumatoid arthritis, Single nucleotide polymorphism (SNP), toxicity, efficacy.

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad articular inflamatoria crónica autoinmune. Afecta aproximadamente al 1% de la población mundial y es por lo menos tres veces más frecuente en las mujeres. En Colombia la prevalencia de la enfermedad fue recientemente estimada en 1,49% (1). El diagnóstico temprano y el tratamiento efectivo evita la destrucción articular, la limitación funcional, la reducción de la calidad de vida, la morbilidad y mortalidad asociados con la progresión natural de la enfermedad (2). Su tratamiento ha cambiado en los últimos 30 años, el esquema terapéutico “piramidal”, en el cual los Fármacos Modificadores de la Enfermedad (DMARDs del inglés *Disease Modifying Antirheumatic Drugs*) se utilizaban en periodos avanzados de enfermedad, ha sido reemplazado por su uso temprano solos o en combinación, con el objetivo de controlar la inflamación, aliviar los síntomas y evitar la progresión de la enfermedad. Lo anterior unido con la introducción de nuevos medicamentos está cambiando la historia natural de la enfermedad, retardando el progreso y evitando la destrucción articular (3-5).

Desde la década de 1980 el MTX se ha posicionado como el medicamento de primera elección para el tratamiento de la AR. Su efectividad y seguridad terapéutica ha sido reportada en múltiples estudios en diferentes poblaciones, su uso continuo reduce la actividad de la enfermedad y previene la destrucción ósea (6-8). Sin embargo, solo el 45% de los pacientes que lo reciben como monoterapia consiguen resultados clínicos significativos a mediano plazo. Un porcentaje de pacientes que varía entre el 15 y el 30%, abandonan el tratamiento después de 3 años de uso debido a la aparición de eventos adversos como trastornos gastrointestinales, cutáneos, alopecia, toxicidad hepática, hematológica y renal que obligan a discontinuarlo (9, 10).

Para explicar esta variabilidad en la respuesta clínica al MTX, se han estudiado varios factores entre los que se destacan aquellos dependientes del paciente (edad, sexo, edad de inicio y duración de la enfermedad), factores relacionados con la enfermedad (mecanismos inmunológicos que condicionan la duración y la severidad de la respuesta inflamatoria, presencia de autoanticuerpos como el factor reumatoide (FR) y el péptido citrulinado (anti CCP)) y más recientemente la variabilidad genética de las enzimas involucradas en la ruta metabólica del

MTX, que pueden constituirse en factores relacionados con eficacia terapéutica o la seguridad del medicamento (11-16)

El MTX es un análogo del ácido fólico, con actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria. El MTX entra a la célula a través del transportador de folato reducido (RFC1), que es codificado por el gen SLC19A1 y sale de la misma gracias a los miembros de la familia de transportadores de casete unidos a ATP (*ABC ATP-binding cassette*) ABCC1 y ABCG2, también conocidos como proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP-1) (12). Dentro de la célula y por acción de la enzima folilglutamato sintetasa (FPGS), se convierte a unas formas de poliglutamatos conocida como MTXPGs, que inhibe la Dihidrofolato reductasa (DHFR) (17) involucrada en la síntesis de novo de purinas, poliaminas y la transmetilación de fosfolípidos y proteínas. Los MTXPGs intervienen en la síntesis de pirimidinas al inhibir la enzima timidilato sintetasa (TYMS), que convierte el desoxiuridilato en deoxitimidilato; inhiben la enzima AICAR transformilasa, codificada por la 5 aminoimidazol-4-carboxamida-ribosil-5fosfato-formiltransferasa (ATIC), esto lleva a la acumulación intracelular de ribonucleótido adenosina carboxamida aminoimidazol (AICA) (18) y a la acumulación intracelular de nucleótidos de adenosina que al desfosforilarse generan aumento de adenosina extracelular, potente agente antiinflamatorio. Los MTXPGs inhiben la proliferación de linfocitos CD3 y CD4, monocitos, macrófagos y neutrófilos, modulan las citocinas, inhiben la producción de factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleucinas (IL)2, IL-4, IL-6, IL8, IL-10, interferon alfa, promueven la transcripción para receptor antagonista de IL-1. La inhibición de la IL-6 e IL-8, disminuye la expresión de E-selectina en la superficie celular, revelando su importancia como mediador en la respuesta antiinflamatoria (19, 20).

El objetivo del estudio fue establecer la asociación entre SNPs en la ruta metabólica del MTX y su eficacia terapéutica y seguridad en pacientes colombianos con AR.

Los polimorfismos estudiados son los principales de la ruta metabólica del MTX y al hacer una revisión en la literatura son los que mayor prevalencia tienen asociada a eficacia, ineficacia y toxicidad.

Metodología

Estudio analítico de corte transversal, con un total de 400 pacientes mayores de 18 años, con diagnóstico de AR

según criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 (21), que asistieron consecutivamente a la clínica de atención ambulatoria de pacientes con AR entre marzo de 2015 y diciembre de 2016 en Hospital Militar Central y en el Centro de Atención Integral para la Artritis Reumatoide (BIOMAB), fueron incluidos en el estudio. En cada paciente se recolectó información relacionada con la enfermedad y sus antecedentes a través de un formulario estructurado, previamente validado (22). La actividad de la enfermedad se cuantificó mediante el uso del instrumento DAS28 (23). Los eventos adversos se determinaron mediante entrevista directa a los pacientes, información que fue constatada con los registros realizados en la historia clínica. Se tomaron muestras de sangre venosa para la medición de biomarcadores séricos relacionados con inflamación: Proteína C Reactiva ultrasensible (PCRus) y velocidad de sedimentación globular (VSG). En todos los pacientes se determinó la presencia del FR_u Anti-CCP, cuadro hemático, transaminasas, fosfatasa alcalina y creatinina.

La eficacia al MXT fue definida por DAS28 <3,2; toxicidad hepática: >3 veces el valor normal de las transaminasas; toxicidad hematológica: leucocitos <4000 mm³, hemoglobina (Hb) <9,5 gr/dl, plaquetas <150,000 mm³; toxicidad renal: creatinina >1,5 mg/dl.

Extracción de DNA

A todos los pacientes que firmaron el consentimiento informado se les tomaron muestras de sangre venosa en tubos con EDTA para la extracción de DNA mediante el kit comercial de *Wizard Genomic DNA Purification* referencia A1120 marca PROMEGA®, según las especificaciones del comerciante. Después de la extracción de DNA se ajustó su concentración a 20 µg/µl mediante la medición con el nanodrop 2000 marca Thermo y se realizó electroforesis para la verificación de la integridad del DNA. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Identificación de los SNPs

Se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR-RT). Para esto se identificaron los *rs* (secuencia de referenciación del SNP) de cada SNP a estudiar, siendo para MTHFR C677T

(rs1801133), MTHFR A1298C (rs1801131), ATIC C347G (rs2371536), RFC1 G80A (rs1051266), FPGS AG (rs1544105) y para DHFR CT (rs10071026), se solicitó a la casa comercial Roche la elaboración de las respectivas sondas y se procesaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El método de genotipado TaQMan (*activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*), se aplicó para analizar los dos SNP (24). El proceso anterior se llevó a cabo en el equipo LightCycler 480 ROCHE® y los resultados fueron analizados por el software LightCycler 480®.

Análisis estadístico

Para la presentación de resultados se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión para las variables continuas y tablas y porcentajes para las variables categóricas. Para la comparación entre eventos adversos y la presencia de los SNPs se utilizó la prueba de χ^2 cuadrado con corrección de Fisher cuando fue necesario. Para las variables continuas, las comparaciones fueron realizadas mediante la *t-Student* o la *U Mann-Whitney* dependiendo de la distribución de las mismas. Las asociaciones encontradas fueron cuantificadas mediante la razón de verosimilitud y sus respectivos intervalos de confianza del 95% usando tablas de 2 x 2; para significancia estadística se estableció un valor de $P < 0,05$.

Aspectos éticos

Según la legislación colombiana este estudio se clasifica como mínimo riesgo según el artículo 11.

El proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de La Sabana (Acta 1470 / 12-12-2014) y por el Hospital Militar Central (Acta N° 005 del 20 de marzo del 2015). A todos los pacientes incluidos en el estudio se les explicó el proyecto y el consentimiento aprobado por los comités, el cual fue firmado, se mantuvo la confidencialidad de la información y se siguieron los principios de la Declaración de Helsinki y la resolución 8430 del Ministerio de Salud de 1993.

Resultados:

Las características clínicas y demográficas de los 400 pacientes son presentados en la tabla 1.

Relación entre polimorfismos y eficacia del MTX

Los pacientes fueron clasificados para los SNPs de la enzima MTHFR C677T y A1298T, la enzima DHFR y la FPGS A1994G acorde a los genotipos ancestrales y mutados, evaluando así mayor eficacia del medicamento. Se encontraron resultados con tendencia a ser significativos para los SNPs de la enzima MTHFR 677 y A1298 $p=0,05$ (OR 1,62, IC95%: 1,02-2,68) y $p=0,048$ (OR 1,74, IC95%:1,01-3,02) respectivamente (Tabla 2).

Relación entre polimorfismos y falta de eficacia del MTX

Al comparar los genotipos de los SNPs relacionados a falta de eficacia del MTX para las enzimas ATIC, ATIC C347 y RFC, en la población estudiada no se encontró ninguna asociación significativa. Para la enzima RFC se encontró que todos los pacientes presentaban heterocigocidad para esta. (tabla 3).

Relación entre polimorfismos y Toxicidad al MTX

Al evaluar cada uno de los polimorfismos relevantes asociados con toxicidad del medicamento, encontramos en nuestra población diferencias significativas para las enzimas DHFR y la ATIC C347 $p=0,0095$ (OR:1,93, IC95%:1,13-3,30) y $p=0,005$ (OR 2 IC95%: 1,2-3,36) respectivamente como se muestra en la tabla 4.

Se compararon los pacientes con y sin tratamiento con MTX, para evaluar la relación de toxicidad a nivel hematológico, hepático y renal. Se documentó tendencia a la leucopenia en pacientes con el uso del medicamento, los demás parámetros de laboratorio en ambos grupos no mostraron diferencias significativas (tabla 5).

Discusión:

En la población estudiada encontramos asociación entre la respuesta terapéutica al MTX y la presencia de los SNPs MTHFR (677T:rs1801133 y 1298C:rs1801131). No encontramos esta asociación para los DHFR (rs10071026) y FPGS (rs1544105) cómo ha sido previamente reportado. Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio que explora simultáneamente la relación de los SNPs de las principales enzimas comprometidas en la ruta metabólica del MTX, con la respuesta y la toxicidad medicamentosa en pacientes colombianos con AR. Resultados similares han sido descritos por Xiao en un grupo de 106 pacientes

chinos con AR, donde los enfermos con el haplotipo de MTHFR 677C-1298C requerían menor dosis de MTX para el control de los síntomas inflamatorios, con menos efectos adversos ($P < 0,05$, OR 2.14, CI 95%: 1,13-4,07) (25). De igual manera, Urano y colaboradores, en 110 pacientes japoneses identificaron los SNPs de la MTHFR encontrando asociación del MTHFR 677T (*rs1801133*) con una mejor respuesta clínica y mientras que los SNPs *rs1801133* y *rs2274976* se relacionaron con el desarrollo frecuente de eventos adversos principalmente gastrointestinales: anorexia, diarrea, dispepsia, hemorragia gastrointestinal, hepatitis, náuseas o vómitos y pancreatitis(26).

Los anteriores resultados adquieren relevancia por la información reportada en población sana colombiana de Bogotá, Medellín, Barranquilla y Cali, en las cuales se hicieron comparaciones del genotipo homocigótico ancestral C/C frente a heterocigóticos mutado C/T y a T/T de la enzima MTHFR, encontrando diferencias significativas ($P = 0,001$ y $P = 0,026$ respectivamente). Lo anterior, podría condicionar un riesgo incrementado toxicidad y presencia de efectos adversos al recibir tratamiento con MTX en nuestra población (27).

Sin embargo, en la literatura existen resultados contradictorios. En población mexicana en 70 pacientes con AR, se documentó mayor toxicidad hepática asociada al alelo mutado MTHFR A1298C (*rs180113*), $P = 0,024$, (OR 2,7, IC95%: 1,11–6,75)(28). Esta misma asociación fue vista en población holandesa donde 205 pacientes con AR en los cuales se inició la administración de MTX, con seguimiento clínico a 6 meses, los pacientes con este polimorfismo presentaron con mayor frecuencia: neumonitis, toxicidad cutánea, gastrointestinal y hepática ($P = 0,005$, OR 2,5, CI: 1,32–4,72) (29). Estos hallazgos parecen ser consistentes en pacientes con otras enfermedades reumáticas tratados con MTX. En población eslovena, en una cohorte de 119 pacientes con artritis juvenil idiopática, con seguimiento a 6 meses, el 55% de los enfermos presentaron efectos adversos y requirieron cambio de terapia farmacológica. Estos pacientes tenían un aumento en la frecuencia del SNP MTHFR *rs1801131* el cual se asoció con toxicidad hepática y gastrointestinal y MTHFR *rs1801133*, el cual se asoció con la suspensión temprana del tratamiento con MTX(30).

El presente estudio analizó la relación de los SNPs de las enzimas en la ruta metabólica del MTX que han sido asociados con la falta de respuesta terapéutica al medicamento: ATIC, ATIC C347G y RFC1 G80A. Para ninguno de ellos se encontró asociación significativa. Resultados que contrastan con los reportados por Dervieux y colaboradores, quienes siguieron por tres meses un grupo de 108 pacientes norteamericanos con

AR luego del inicio de la terapia con MTX. Se analizó el SNPs RFC-1 80GA el cual se asoció con mayor actividad inflamatoria de la enfermedad: incremento del recuento articular y aumento en la calificación de la escala visual análoga de dolor. Situación similar se encontró para el SNP ATIC C347G (*rs237253*) (31).

Cuando analizamos la relación de los SNPs asociados en otras poblaciones a toxicidad del medicamento encontramos resultados similares con respecto a los SNPs DHFR CT(*rs10071026*) y la ATIC C347G (*rs2371536*). Un estudio realizado en 211 pacientes con AR provenientes de Europa central en los cuales se determinó los principales polimorfismos de las enzimas comprometidas en la ruta metabólica del MTX, encontró asociación del ATIC C347 con mayor riesgo de toxicidad, $P=0,024$ (OR 2,49, CI95%:1,13-5,53) (32). Iguales resultados fueron reportados Salazar y colaboradores en 124 pacientes españoles con AR en monoterapia con MTX, documentando que el polimorfismo para la enzima ATIC, se relacionó con incremento en las reacciones adversas; hepatotoxicidad, trastornos gastrointestinales y alopecia. Así mismo se evaluó el polimorfismo para DHFR la cual tuvo relación con una mayor respuesta al tratamiento sin asociación a toxicidad (33).

Owen y colaboradores, en Reino Unido en 309 pacientes se realizó estudio de polimorfismos en manejo con MTX encontrando que la mutación para DHFR (*rs12517451*) tenía una alta asociación con toxicidad (OR 1.68, CI 95%: 1,03-2,75), sin embargo otras secuencias de referencias para DHFR (*rs10072026* y *rs1643657*) se asociaron con la disminución del riesgo de presentar efectos adversos relacionados con el medicamento (34).

En cuanto a las comorbilidades cardiovasculares fueron halladas en 45% de la población colombiana las más frecuentes enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica, los polimorfismos de MTHFR también se han visto implicados en la aparición de enfermedad CV en la población sana. Específicamente, los pacientes con el polimorfismo MTHFR C677T pueden tener un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Además, las personas que son homocigóticas para el polimorfismo MTHFR C677T demuestran niveles aumentados de homocisteína, y las concentraciones elevadas de este aminoácido pueden conferir un riesgo adicional para CV y enfermedad cerebrovascular (35). Dado que la enfermedad cardiovascular es la causa más común de morbilidad y mortalidad en pacientes con AR, se ha propuesto que los polimorfismos de MTHFR son un potencial riesgo aditivo no tradicional de eventos cardiovasculares. Otro

estudio observacional prospectivo, en población española, 612 pacientes de edad media 53 años, con un período de seguimiento de 14 años hubo una asociación entre los eventos cardiovasculares y la disfunción endotelial relacionada con el genotipo MTHFR A1298C, pero no con C677T(36).

Conclusiones:

La población colombiana comparte datos con respecto a los SNPs asociados a eficacia y toxicidad del MTX, sin embargo, los polimorfismos asociados con la ineficacia según la literatura no se documentan en los resultados arrojados. La variabilidad en los resultados permite sugerir que las discrepancias entre poblaciones es la que determina los distintos desenlaces, lo cual invita a reproducir el estudio en cada país. Estos SNPs podrían establecerse como biomarcadores de la respuesta al metotrexato en términos de eficacia y toxicidad en nuestra población colombiana con AR.

Tabla 1. Características generales de la población

Características	Pacientes (n = 400)
Edad en años (Media±DS)	60,7±13,9
Edad inicio enfermedad en años (Media ±SD)	47,6±15,1
Duración de la enfermedad en años (Media ±SD)	13,2±10,9
Femenino (%)	304 (76,0)
Nivel socioeconómico medio-bajo (%)	314 (78,4)
Comorbilidades cardiovasculares (%)	180 (45,0)
Osteoporosis (%)	81 (20,3)
FR positivo (%)	361 (90,2)
anti-CCP positivo (%)	326 (81,6)
PCRus ($\geq 5,5$ mg/l; %)	176 (44,1)
DMARDs Sintético	
MTX (%)	346 (86,8)
Leflunomida (%)	145 (36,2)
Antimalárico (%)	78 (19,5)
Sulfasalazina (%)	46 (11,5)
Tofacitinib (%)	8 (2,1)
DMARDs Sintético combinaciones más frecuentes	
MTX + Leflunomida (%)	68 (17,1)
MTX + Antimaláricos (%)	49 (12,2)
MTX + Sulfasalazina (%)	22 (5,6)
DMARDs Biológicos más MTX (%)	110 (27,5)

*DS: desviación estándar; FR: factor reumatoide; anti-CCP: Anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado; usPCR: proteína C-reactiva ultrasensible; DMARDs: Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad;

Tabla 2. Relación Polimorfismos Genéticos y Eficacia MTX

Polimorfismo	n	Actividad (%)	Remisión (%)	OR (IC-95%)	p
MTHFR C677T	344	189	155		
CC	81	37 (20)	44 (28)	1,62 (1,0-2,68)	0,05
TT	263	152 (80)	111 (72)		
MTHFR A1298T	381	219	162		
AA	312	172 (79)	140 (86)	1,74 (1,01-3,02)	0,048
TT	69	47 (21)	22 (14)		
DHFR	394	225	165		
CC	233	131(58,2)	95(57,6)	1,03(0-68-1,55)	0,484
TT	161	91 (40,5)	68 (41,2)		
FPGS A1994G	400	225	165		
AA	137	74 (32,9)	57(34,5)	1,92 (0,69-1,41)	0,406
GG	263	151(67,7)	108(65,5)		

* MTHFR: Metil Tetrahidrofolato Reductasa, DHFR: Dihidrofolato reductasa, FPGS: Folilglutamato sintetasa, IC: Intervalo de confianza

Tabla 3. Relación Polimorfismos Genéticos e Ineficacia MTX

POLIMORFISMO	n	Actividad (%)	Remisión (%)	OR- (IC95%)	p
ATIC	386	222	164		
CC		22(10)	13(8)	1,27 (0,62-2,61)	0,50
TT		200 (90)	151(92)		
ATIC C347G	385	222	163		
CC		88(40)	58(36)		
GG		134(60)	105(64)	1,18 (0,78-1,80)	0,41
RFC G80A	388	223	165		
CC		0	0		
TT		223	165		

*ATIC: aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa RFC: transportador de folato reducido, IC: Intervalo de confianza.

Tabla 4. Relación Polimorfismos Genéticos y Toxicidad MTX

POLIMORFISMO	n	Toxicidad	OR (IC 95%)	p
MTHFR C677T	316	81		
CC	74	22	1,31 (0,73-2,34)	0,21
TT	242	59		
MTHFR A1298T	312	80		
AA	261	70	1,50 (0,71-3,16)	0,184
TT	51	10		
DHFR	313	81		
CC	120	55	1,93(1,13-3,30)	0,0095
TT	110	26		
ATIC C347G	313	80		
CC	121	41	2 (1,2-3,36)	0,005
GG	192	39		

* MTHFR: Metil Tetrahidrofolato Reductasa, DHFR: Dihidrofolato reductasa, ATIC: aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa, IC: Intervalo de confianza.

Tabla 5. Comportamiento de laboratorios con y sin MTX

Laboratorios	MTX	SIN MTX	p
AST	24,2 ±10,04	23,11 ±15,1	
ALT	27,50±17,7	19,43±9,0	0,813
Creatinina	0,80±0,22	0,84±0,32	0,562
Leucocitos	6105,8±2196,3	7459,47±5131	0,056
Hemoglobina	14,18±1,62	14,13±2	0,914
Plaquetas	287664,47±87326,7	264000±56675,9	0,192

*AST: Aspartato transaminasa, ALT: Alanina aminotransferasa, MTX: MTX.

Bibliografía

1. Santos AM, Rueda JC, Angarita JI, Giraldo R, Forero E, Pelaez-Ballestas I, Munoz JGB, Saldarriaga EL, Ramirez J, Toro C, Londono J. Prevalence of Rheumatic Disease in an Adult Population from Colombia. A COPCORD Methodology Study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2017;76:752-3.
2. Anderson J, Caplan L, Yazdany J, Robbins ML, Neogi T, Michaud K, Saag KG, O'Dell JR, Kazi S. Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of Rheumatology recommendations for use in clinical practice. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:640-7.
3. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gossec L, Nam J, Ramiro S, Winthrop K, de Wit M, Aletaha D, Betteridge N, Bijlsma JW, Boers M, Buttgereit F, Combe B, Cutolo M, Damjanov N, Hazes JM, Kouloumas M, Kvien TK, Mariette X, Pavelka K, van Riel PL, Rubbert-Roth A, Scholte-Voshaar M, Scott DL, Sokka-Isler T, Wong JB, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 2014;73:492-509.
4. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, Bridges SL, Jr., Chatham WW, Paulus HE, Suarez-Almazor M, Bombardier C, Dougados M, Khanna D, King CM, Leong AL, Matteson EL, Schousboe JT, Moynihan E, Kolba KS, Jain A, Volkmann ER, Agrawal H, Bae S, Mudano AS, Patkar NM, Saag KG. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:625-39.
5. O'Dell JR, Leff R, Paulsen G, Haire C, Mallek J, Eckhoff PJ, Fernandez A, Blakely K, Wees S, Stoner J, Hadley S, Felt J, Palmer W, Waytz P, Churchill M, Klassen L, Moore G. Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate and hydroxychloroquine, methotrexate and sulfasalazine, or a combination of the three medications: results of a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002;46:1164-70.
6. Emery P, Breedveld FC, Hall S, Durez P, Chang DJ, Robertson D, Singh A, Pedersen RD, Koenig AS, Freundlich B. Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double-blind, parallel treatment trial. *Lancet* 2008;372:375-82.
7. Treon SP, Chabner BA. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* 1996;42:1322-9.
8. Verhoeven AC, Boers M, Tugwell P. Combination therapy in rheumatoid arthritis: updated systematic review. *Br J Rheumatol* 1998;37:612-9.

9. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum* 1998;27:277-92.
10. Grim J, Chladek J, Martinkova J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:139-51.
11. Edno L, Bressolle F, Gomeni R, Bologna C, Sany J, Combe B. Total and free methotrexate pharmacokinetics in rheumatoid arthritis patients. *Ther Drug Monit* 1996;18:128-34.
12. Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am* 1997;23:739-55.
13. Blits M, Jansen G, Assaraf YG, van de Wiel MA, Lems WF, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Voskuyl AE, Wolbink GJ, Vosslander S, Verweij CL. Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:2791-802.
14. Umicevic Mirkov M, Coenen MJ. Pharmacogenetics of disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: towards personalized medicine. *Pharmacogenomics* 2013;14:425-44.
15. Zhu H, Deng FY, Mo XB, Qiu YH, Lei SF. Pharmacogenetics and pharmacogenomics for rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate treatment: the 2013 update. *Pharmacogenomics* 2014;15:551-66.
16. Romao VC, Lima A, Bernardes M, Canhao H, Fonseca JE. Three decades of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis: can we predict toxicity? *Immunol Res* 2014;60:289-310.
17. Boughrara W, Benzaoui A, Aberkane M, Moghtit FZ, Dorgham S, Lardjam-Hetraf AS, Ouhaibi-Djellouli H, Teixeira EP, Boudjema A. No correlation between MTHFR c.677 C > T, MTHFR c.1298 A > C, and ABCB1 c.3435 C > T polymorphisms and methotrexate therapeutic outcome of rheumatoid arthritis in West Algerian population. *Inflamm Res* 2017;66:505-13.
18. Ranganathan P. An update on methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2008;9:439-51.
19. Lee YH, Bae SC. Association of the ATIC 347 C/G polymorphism with responsiveness to and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2016;36:1591-9.
20. Restrepo LF, Giraldo R, Londoño J, Pinzón C, Cortes A, Ballesteros G, Santos AM. Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide. Revisión sistemática. *Revista Colombiana de Reumatología* 2016.
21. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1580-8.
22. Santos AM, Saldarriaga EL, Giraldo-Bustos R, Ballesteros-Munoz JG, Rueda JC, Cuervo FM, Angarita JI, Vasquez AY, Arias-Correal S, Gonzalez CA, Santos-Moreno P,

- Londono J. Dickkopf 1 protein circulating levels as a possible biomarker of functional disability and chronic damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2017.
23. Munoz J, Giraldo R, Santos A, Bello-Gualteros J, Rueda J, Saldarriaga E, Angarita J, Arias-Correal S., Vasquez A, Londono J. Correlation between rapid-3, DAS28, CDAI and SDAI as a measure of disease activity in a cohort of Colombian patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2016.
24. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7276-80.
25. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, Akama H, Kitamura Y, Kamatani N. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002;12:183-90.
26. Xiao H, Xu J, Zhou X, Stankovich J, Pan F, Zhang Z, Xu S, Lian L, Ding C. Associations between the genetic polymorphisms of MTHFR and outcomes of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:728-33.
27. Romero-Sanchez C, Gomez-Gutierrez A, Gomez PE, Casas-Gomez MC, Briceno I. C677T (RS1801133) MTHFR gene polymorphism frequency in a colombian population. *Colomb Med (Cali)* 2015;46:75-9.
28. Mena JP, Salazar-Paramo M, Gonzalez-Lopez L, Gamez-Nava JI, Sandoval-Ramirez L, Sanchez JD, Figuera LE, Munoz-Valle FJ, Vazquez del Mercado M, Davalos IP. Polymorphisms C677T and A1298C in the MTHFR gene in Mexican patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: implication with elevation of transaminases. *Pharmacogenomics J* 2011;11:287-91.
29. Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Kerstens PJ, van Zeben D, Breedveld FC, Dijkmans BA, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum* 2006;54:1087-95.
30. Zajc Avramovic M, Dolzan V, Toplak N, Accetto M, Lusa L, Avcin T. Relationship Between Polymorphisms in Methotrexate Pathway Genes and Outcome of Methotrexate Treatment in a Cohort of 119 Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol* 2017;44:1216-23.
31. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, Kremer J. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2766-74.
32. Grabar PB, Rojko S, Logar D, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms in the adenosine pathway. *Ann Rheum Dis* 2010;69:931-2.
33. Salazar J, Moya P, Altes A, Diaz-Torne C, Casademont J, Cerda-Gabaro D, Corominas H, Baiget M. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics* 2014;15:1079-90.

34. Owen SA, Lunt M, Bowes J, Hider SL, Bruce IN, Thomson W, Barton A. MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms. *Pharmacogenomics J* 2013;13:137-47.
35. Fan AZ, Yesupriya A, Chang MH, House M, Fang J, Ned R, Hayes D, Dowling NF, Mokdad AH. Gene polymorphisms in association with emerging cardiovascular risk markers in adult women. *BMC Med Genet* 2010;11:6.
36. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Rodriguez L, Miranda-Filloo JA, Fernandez-Gutierrez B, Llorca J, Martin J, Gonzalez-Gay MA. A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R71.