



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Facultat de Medicina
Departament de Medicina
2015**

Estudios farmacogenéticos del metotrexato en la artritis reumatoide

**Tesis doctoral presentada para optar al grado de Doctor.
Programa de Doctorado en Medicina.**

**Directores de tesis:
Dr. Hèctor Corominas i Macias
Dra. Montserrat Baiget Bastus
Dr. Jordi Casademont i Pou**

**Doctoranda:
Patricia Moya Alvarado**

CONTENIDO

Abreviaturas	5
Figuras.....	7
Tablas.....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Artritis reumatoide.....	13
1.1.1 Introducción.....	13
1.1.2 Epidemiología.....	13
1.1.3 Etiopatogenia.....	14
1.1.3.1 La base genética.....	15
1.1.3.2 El/Los factor hormonal.....	17
1.1.3.3 Las infecciones.....	18
1.1.3.4 El tabaquismo.....	19
1.1.3.5 El nivel socioeconómico y la educación	19
1.1.3.6 Los autoanticuerpos.....	19
1.1.4 Anatomía patológica.....	20
1.1.5 Fisiopatología.....	21
1.1.6 Manifestaciones clínicas.....	25
1.1.6.1 Enfermedad articular.....	26
1.1.6.2 Manifestaciones extraarticulares.....	28
1.1.7 Hallazgos de laboratorio.....	28
1.1.8 Diagnóstico. Criterios clasificatorios.....	29
1.1.9 Evaluación de la enfermedad.....	31
1.1.9.1 Parámetros que evalúan el grado de actividad.....	31
1.1.9.2 Índices de actividad compuestos	32
1.1.9.3 Clasificación del grado de actividad inflamatoria.....	33
1.1.9.4 Evaluación de la discapacidad física.....	35
1.1.10 Tratamiento.....	36
1.1.10.1 Recomendaciones y Guía de Práctica Clínica de la SER.....	36
1.1.10.2 Recomendaciones EULAR.....	37
1.1.10.3 Tratamientos farmacológicos.....	39
1.1.10.4 Otros tratamientos no farmacológicos.....	40

1.1.11	Criterios de respuesta al tratamiento.....	41
1.2	Genética y farmacogenética.....	43
1.2.1	Principios generales de genética.....	43
1.2.1.1	Estructura del ADN y de los genes	43
1.2.1.2	Variantes genéticas	45
1.2.1.3	Haplotipos y desequilibrio de ligamiento.....	46
1.2.1.4	Proyecto Hapmap.....	46
1.2.2	Principios generales de farmacogenética.....	47
1.2.3	Estudios farmacogenéticos del metotrexato	47
1.2.3.1	Genes de la vía metabólica del ácido fólico que son diana del MTX	49
-	Metilentetrahidrofolato Reductasa (<i>MTHFR</i>).....	49
-	Dihidrofolato Reductasa (<i>DHFR</i>).....	50
-	Timidilato Sintetasa (<i>TS</i>).....	50
-	Ciclina D1 (<i>CCND1</i>).....	51
-	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótidoformil transferasa (<i>ATIC</i>).....	51
1.2.3.2	Genes implicados en el transporte celular del MTX y en su poliglutamación	52
-	Transportador de folato reducido de proteína 1 (<i>RFC1/SLC19A1</i>).....	52
-	ATP-binding cassette B1 (<i>ABCB1</i>).....	52
-	Folipoliglutamato sintetasa (<i>FPGS</i>).....	52
-	Gamma glutamil hidrolasa (<i>GGH</i>).....	52
2	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	53
3	RESULTADOS.....	57
3.1	Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients?.....	59
3.2	Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients.....	73
4	DISCUSIÓN.....	103
4.1	Estudios farmacogenéticos de la vía metabólica del ácido fólico que son diana del MTX1.....	105
4.1.1	Metilentetrahidrofolato Reductasa (<i>MTHFR</i>).....	105

4.1.2	Dihidrofolato Reductasa (<i>DHFR</i>).....	109
4.1.3	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótidoformil transferasa (<i>ATIC</i>).....	109
4.1.4	Timidilato Sintetasa (<i>TS</i>).....	111
4.1.5	Ciclina D1 (<i>CCND1</i>).....	112
4.2	Estudios farmacogenéticos de los genes implicados en el transporte intra y extracelular del MTX y en su poliglutamación.....	113
4.2.1	Transportador de folato reducido de proteína 1 (<i>RFC1/SLC19A1</i>).....	113
4.2.2	Folipoliglutamato sintetasa (<i>FPGS</i>).....	114
4.2.3	ATP-binding cassette B1 (<i>ABCB1</i>).....	116
4.2.4	Gamma glutamil hidrolasa (<i>GGH</i>).....	118
4.3	Estudios farmacogenéticos del metotrexato en artritis reumatoide. Actualidad y limitaciones.....	119
5	CONCLUSIONES.....	123
6	BIBLIOGRAFIA.....	127
7	ANEXO	151
	- Anexo 1. Efectos adversos.....	153
	- Anexo 2. Polimorfismos de los genes implicados en la vía metabólica del ácido fólico, el transporte celular del MTX y en su poliglutamación seleccionados para el estudio.....	154

ABREVIATURAS

AA: Amiloidosis

ABA: Abatacept

ACPA: Anticuerpos anticitrulina

ACR: *American College Of Rheumatology*

ADA: Adalimumab

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AINEs: Fármacos antiinflamatorios no esteroideos

ANK: Anakinra

Anti-TNF: Anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral

AR: Artritis Reumatoide

ARA: *American Rheumatology Association*

ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótidoformil transferasa/IMP

CCND1: Ciclina D1

CERTO: Certolizumab pegilado

DHFR: Dihidrofolato Reductasa

DHODH: Dihidro-orotato deshidrogenasa

EC: Epítoto compartido

ETN: Etanercept

EULAR: *European League Against Rheumatism*

EVA: Escala Visual Analógica

FME: Fármaco modificador de la enfermedad

FPGS: Folipoliglutamato sintetasa

FR: Factor reumatoide

GC: Glucocorticoides

GGH: Gamma Glutamil Hidrolasa

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

GOLI: Golimumab

HAQ: *Health Assessment Questionnaire*

HCQ: Hidroxicloroquina

ICAM: Moléculas de adhesión intercelular endotelial

IFN: Interferón

IFX: Infliximab

IL: Interleukina

IR: Índice de Ritchie
JAK: Vía de Janus quinasa
LEF: Leflunomida
LES: Lupus eritematoso sistémico
Lt- β : Limfotoxina Beta
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno
MTHFR: Metilentetrahidrofolato Reductasa
MTX: Metotrexato
MTXPG: Metotrexato poliglutamado
NAD: Número de articulaciones dolorosas
NAT: Número de articulaciones tumefactas
NLRs: Receptores *NOD-like*
OMERACT: *Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials*
PCR: Proteína C reactiva
PAD: Peptidil arginina desaminasa
RANKL: Factor nuclear kappa-B ligando
RNM: Resonancia Magnética
RTX: Rituximab
SER: Sociedad Española de Reumatología
SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*
SZP: Salazopirina
TCZ: Tocilizumab
THF: Tetrahidrofolato
TLRs: Receptores toll-like
TS: Timidilato sintetasa
VCAM: Moléculas de adhesión vascular
VSG: Velocidad de sedimentación glomerular

FIGURAS

- Figura 1. Representación esquemática de los factores relevantes en el desarrollo de la artritis Reumatoide.
- Figura 2. Biopsia sinovial en Artritis Reumatoide
- Figura 3. Fisiopatología de la artritis reumatoide
- Figura 4. Fotografía de las manos de un paciente con AR de años de evolución.
- Figura 5. Estructura del ADN
- Figura 6. Los aminoácidos y combinaciones de tres nucleótidos posibles.
- Figura 7. Vía metabólica y de transporte del Metotrexato
- Figura 8. Secuencia variable de repeticiones en tándem (VNTR) de 28 pares de bases situado en la región promotora de la TS .

TABLAS

- Tabla 1. Criterios de clasificación de la artritis reumatoide de la ACR (1987)
- Tabla 2. Criterios de clasificación de la EULAR / ACR de 2010
- Tabla 3. Conjunto mínimo de parámetros para evaluación de la AR recomendados por OMERCT 1993
- Tabla 4. Criterios ACR de remisión clínica de AR
- Tabla 5. Puntos de corte para las categorías de actividad según el DAS, DAS28 y SDAI
- Tabla 6. Recomendaciones del consenso EULAR para el tratamiento de pacientes con AR.
- Tabla 7. Definición de respuesta de EULAR (DAS28)
- Tabla 8. Revisión de los estudios publicados de *rs1801133* localizado en el gen *MTHFR* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide
- Tabla 9. Revisión de los estudios publicados de *rs1801131* localizado en el gen *MTHFR* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.
- Tabla 10. Revisión de los estudios publicados del gen *DHFR* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.
- Tabla 11. Revisión de los estudios publicados del gen *ATIC* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.
- Tabla 12. Revisión de los estudios publicados del gen *SLC19A1/RFC-1* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.
- Tabla 13. Revisión de los estudios publicados del gen *FPGS* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.
- Tabla 14. Revisión de los estudios publicados del gen *ABCB1* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.
- Tabla 15. Revisión de los estudios publicados del gen *GGH* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ARTRITIS REUMATOIDE

1.1.1. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, crónica, autoinmune y sistémica de etiología desconocida. Su principal órgano diana es la membrana sinovial y se caracteriza por la inflamación poliarticular y simétrica de pequeñas y grandes articulaciones, con posible compromiso sistémico en cualquier momento de su evolución (Mody GM 2008).

Desde las fases iniciales de la enfermedad, la artritis reumatoide afecta de manera significativa las actividades diarias de las personas que la padecen. En la mayoría de los pacientes la enfermedad presenta una evolución crónica fluctuante que, en caso de no tratarse sigue un curso progresivo, y ocasiona destrucción e incapacidad de las articulaciones afectadas (Scott et al. 1987; Pincus et al. 1984; Isomäki 1992; Wolfe 1996). La destrucción articular afecta directamente a las relaciones personales y sociales, a la actividad laboral y a la situación económica del individuo y su familia, y está directamente relacionada con el incremento del gasto y la aparición de comorbilidad (Sherrer et al. 1986).

Aunque no existe propiamente un tratamiento de la enfermedad, los fármacos existentes en la actualidad logran controlar la enfermedad en la mayoría de los pacientes, consiguiéndose un buen control del dolor, frenan el daño estructural articular, la aparición de deformidades, evitan el deterioro funcional y mejoran la calidad de vida.

1.1.2. EPIDEMIOLOGIA

Las tasas de incidencia son mayores en el norte de Europa y América en comparación con el sur de Europa. La incidencia total de AR, basándose en los criterios diagnósticos del *Colegio Americano de Reumatología* (ACR) de 1987, es de un 25 por 100.000 habitantes. La incidencia observada media en el norte de Europa es de 29 casos, en Norte América de 38 casos, y en el sur de Europa de 16,5 casos por 100.000 habitantes (Alamanos, Voulgari, and Drosos 2006).

La prevalencia mundial de AR es del 0,3 al 1,2% (Silman AJ, Horchberg MC 1993). Del mismo modo que sucede con la incidencia, en el norte de Europa y América del Norte se han descrito mayores tasas de prevalencia, que van desde 0,4% a 1% en comparación con el resto del mundo. España tiene una prevalencia estimada del 0,5% (existen entre 150.000 y 200.000 pacientes con AR en España) (Ballina et al. 2002). Las tasas de prevalencia en África y Asia tienden a ser más bajas, están entre 0,2% y 0,3%, con tasas más altas en las zonas urbanas.

Se han descrito altas tasas de prevalencia de AR en ciertos grupos de nativos americanos, entre ellos el de Pima, Yakima, y Chippewa. Estas prevalencias no se han documentado en otros nativos americanos, como las tribus Blackfoot y Haida (Mulero Mendoza et al. 2000).

Como la mayoría de enfermedades autoinmunes, la AR es más prevalente en mujeres que en hombres, con una relación de 4:1 (Ballina et al. 2002) y tiene una mayor incidencia entre los 40 y 60 años de edad (Hochberg and Spector 1990).

La tasa de mortalidad es 2 veces mayor en la población con AR que en el resto de la población (Gonzalez et al. 2007; Wolfe et al. 1994), y estas diferencias han ido en aumento durante las últimas 4 décadas (Gonzalez et al. 2007).

1.1.3. ETIOPATOGENIA

La etiopatogenia de la AR es compleja, debido a la gran diversidad de mecanismos que actúan conjunta o secuencialmente. Esquemáticamente se puede considerar que la AR es el resultado de la interacción de una carga genética y un antígeno desconocido, que desencadenan un escenario inflamatorio sinovial que puede hacerse crónico (Figura 1).

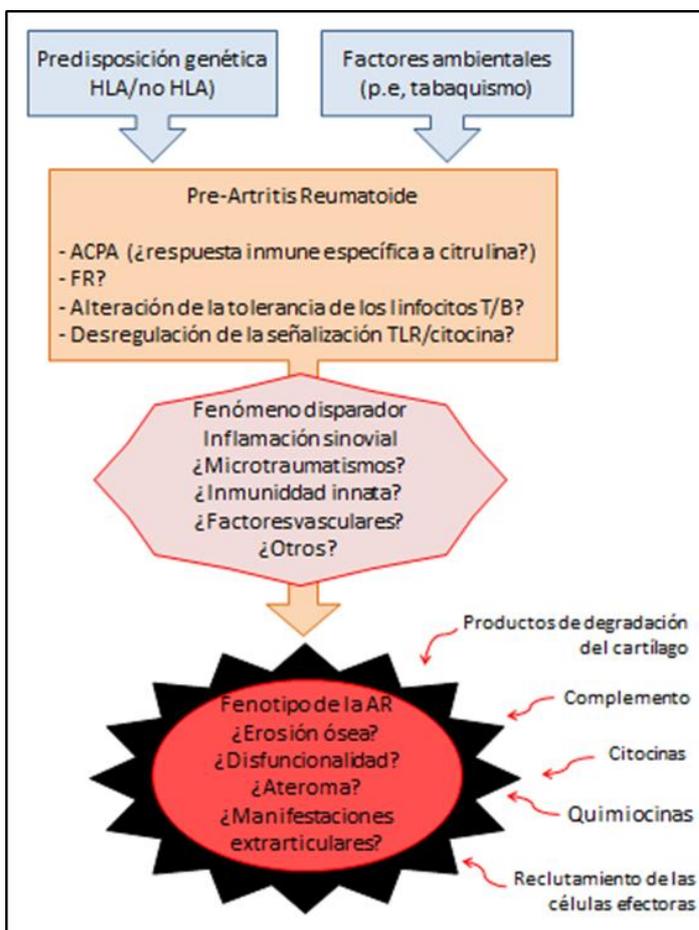


Figura 1. Representación esquemática de los factores relevantes en el desarrollo de la artritis Reumatoide. La interacción de varios determinantes genéticos y ambientales crea una situación inmune adversa en el individuo predispuesto, que puede incluir la producción de ACPA. No se sabe un mecanismo disparador que dañe específicamente el tejido sinovial, aunque probablemente intervengan la inmunidad innata y luego la interacción de factores genéticos y ambientales. Después se pone en marcha una cascada inflamatoria auto-perpetuada que da lugar al fenotipo clínico de la AR, reconocible aunque heterogéneo. FR: Factor Reumatoide; HLA: antígeno leucocitario humano; TLR: Receptor tipo Toll.

1.1.3.1 La base genética:

HLA y epítoto compartido

La contribución de la variación genética en la región del antígeno leucocitario humano (HLA) fue reconocida por primera vez en 1978 (Huizinga et al. 2005). Actualmente hay descritos más de 20 alelos que estiman un tercio del riesgo de la carga genética de las AR seropositivas (Ollier et al. 2001). La región HLA del cromosoma 6, es la región más densa-gen del genoma de los mamíferos, y desempeña un papel importante en el sistema inmunológico. Durante las últimas 4 décadas, muchos estudios genéticos han demostrado la importancia de la región HLA en la susceptibilidad a la AR. Se ha descrito una asociación significativa con el HLADR4, concretamente con los subtipos DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405 y DRB1*0408 y presentar AR (Jawaheer and Gregersen 2002; Cornélis et al. 1998).

Con la llegada de la sofisticada tipificación de ADN para los alelos HLA-DRB1, se ha observado que no todos los alelos HLA-DR4 se asocian con AR y que diferentes alelos confieren riesgo de AR en diferentes poblaciones étnicas (Milicic et al. 2002).

En 1987, Peter Gregersen y su equipo de trabajo propusieron una hipótesis para estas asociaciones complejas y diversas (Gregersen, Silver, and Winchester 1987). Ellos mostraron que los alelos de riesgo de AR comparten similitudes en una secuencia de cinco aminoácidos (Stewart et al. 2004; Smerdel et al. 2002) en la tercera región hipervariable del gen HLA-DRB1 (70QRRRAA74, 70QRRRAA74, 70QRRRAA74). Estas secuencias son importantes en el proceso de reconocimiento antigénico, y por lo tanto existe la hipótesis de que los alelos asociados con la AR se unen a péptidos específicos, que a su vez facilita el desarrollo de las células T autorreactivas. Estos alelos son conocidos como alelos "epítoto compartido" (EC).

Aunque los alelos de susceptibilidad del EC se consideran a menudo como un grupo, la susceptibilidad de presentar AR difiere entre los alelos DRB1 individualmente (Fernando et al. 2008). En general, los alelos DRB1 *0401 y *0405 exhiben un alto nivel de riesgo, con un riesgo relativo de aproximadamente 3. Los alelos DRB1 *0101, *0404, *0901 y *1001 presentan un riesgo relativo más moderado en el rango de 1.5. Cada vez es más claro que los alelos HLA-DRB1 del EC influyen en gran medida el desarrollo de AR seropositiva (Irigoyen et al. 2005; Huizinga et al. 2005) .

Moléculas no- HLA

Los cálculos basados en las tasas de concordancia entre gemelos monocigóticos y el haplotipo HLA en hermanos, indican que los genes HLA aportan aproximadamente el 30% del riesgo genético total para la AR (Seldin et al. 1999; Deighton et al. 1989). Esto deja un amplio margen de otros genes fuera de la región HLA que pueden contribuir al riesgo de AR. Es probable que el riesgo genético restante se distribuya entre muchos *loci* del genoma humano (Jawaheer and Gregersen 2002).

A) PTPN22: Una variante en el gen PTPN22 que cambia una arginina por un triptófano, fue el primer gen asociado con AR, después del HLA. Esta modificación altera la unión de la proteína PTPN22 con una molécula de señalización intracelular que altera el umbral de activación de las células T (Vang et al. 2005; Begovich et al. 2004). Este mecanismo parece que predispone a la autoinmunidad en general y a la AR con anticuerpos anticitrulina (ACPA) en particular.

B) PADI4: Se ha descrito una variante del gen PADI4 que codifica para una enzima que después de la traducción sustituye una arginina por una citrulina. Esta variante tiene un papel importante en la generación de autoanticuerpos tipo ACPA. Se ha descrito un incremento en el riesgo de AR en los portadores de una variante común de PADI4 en una cohorte asiática (Suzuki et al. 2003; Iwamoto et al. 2006). En población de ascendencia europea, el mismo alelo también se asocia con el riesgo de AR con una significación menor (OR <1,10) (Plenge et al. 2005; Iwamoto et al. 2006; Barton et al. 2004).

C) CTLA4: CTLA4 es un regulador negativo de la activación de células T. La asociación entre CTLA4 y la susceptibilidad a la autoinmunidad se confirmó inicialmente entre los pacientes con diabetes tipo 1 y la tiroiditis autoinmune (Ueda et al. 2003). Diferentes estudios han ampliado estos resultados a la AR, donde la magnitud del efecto genético es reproducible pero modesta (Lei et al. 2005; Plenge et al. 2005). Una vez más, la asociación es más fuerte entre los pacientes con AR de autoanticuerpos positivos.

D) STAT4: Se han identificado diferentes polimorfismos en el gen STAT4 como factor de riesgo de desarrollar AR ACPA-positiva. El gen STAT4 codifica un factor de transcripción que interviene en la diferenciación de los linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1) y los Th17. Remmers y colaboradores (Remmers et al. 2007) estudiaron polimorfismos de este gen y encontraron una asociación con la AR en una muestra de 7500 pacientes. Estos resultados han sido replicados en otros estudios (Martínez et al. 2008; Barton et al. 2008).

E) TNFAIP3: TNFAIP3, también conocida como A20, es un potente inhibidor de la señalización de NF-kappa B y es necesario para la terminación de señales inducida por TNF (Opipari, Boguski, and Dixit 1990). Los niveles de TNF- α se incrementan en pacientes con AR, y la inhibición de TNF- α es un potente tratamiento de la AR grave (Elliott et al. 1994). Además, los ratones que carecen de TNFAIP3 demuestran inflamación crónica (E. G. Lee et al. 2000), consistente con la pérdida de la función de este gen que juega un papel en la autoinmunidad. Aunque puede ser lógico concluir que los alelos de riesgo RA alteran la expresión TNFAIP3, no hay datos directos para apoyar esta afirmación.

F) TRAF1: El TRAF-1 (factor 1 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral) está involucrado en la señalización del TNF α a través del TNFR-1 y también en la vía de NFkB en la inducción de enfermedad. Diferentes grupos de trabajo han descrito una asociación entre un polimorfismo en TRAF1 y la susceptibilidad de padecer AR con anticuerpos anticitrulina positivos (Fina A S Kurreeman et al. 2007; M. Chang et al. 2008; Zervou et al. 2008; F A S Kurreeman et al. 2008; Barton et al. 2008).

1.1.3.2 El/Los factores hormonales

La acción de factores hormonales podría considerarse como un factor de susceptibilidad para el desarrollo de AR debido a su mayor prevalencia en mujeres, especialmente durante la etapa fértil, y a la mejoría de la actividad de la enfermedad descrita durante la gestación (Nelson et al., 1993).

A partir de los resultados de varios estudios de casos y controles, la nuliparidad ha sido sugerida como un factor de riesgo para padecer AR. Sin embargo, la asociación es inconsistente y en dos estudios de cohorte prospectivos esta hipótesis no se ha confirmado (Heliövaara et al. 1995; Hernández Avila et al. 1990).

Hay pruebas de que el embarazo influye en el momento de aparición de la enfermedad. Un estudio mostró que el riesgo de la AR de reciente comienzo se reduce durante el embarazo en sí, pero se incrementa en los 12 meses después del parto (Silman 2015). Este efecto fue más evidente después del primer embarazo.

Asimismo, datos recientes muestran que las mujeres que dan lactancia tienen un menor riesgo para desarrollar AR (Pikwer et al. 2009). Un estudio prospectivo de Estados Unidos observó que la lactancia materna durante más de 12 meses se asocia con un menor riesgo de la AR y que el riesgo disminuye al aumentar la duración de la misma (Pikwer et al. 2009).

La importancia del momento del embarazo para el inicio y la gravedad de la AR sugiere una contribución de los factores hormonales. Las mujeres con AR tienen una deficiencia relativa de andrógenos, con menores concentraciones de testosterona y dehidroepiandrosterona (Masi, Chatterton, and Aldag 1999); sin embargo, esta asociación no ha sido confirmada en estudios posteriores (Elizabeth W Karlson et al. 2009).

El uso de hormonas exógenas (anticonceptivos orales) también ha sido estudiado pero con resultados contradictorios. En la mayoría de los estudios, el uso de anticonceptivos orales se ha demostrado que disminuye el riesgo de la AR (Allebeck et al. 1984; Brennan et al. 1997; Doran et al. 2004); sin embargo, otros no muestran esta asociación (Hannaford, Kay, and Hirsch 1990; Deighton, Sykes, and Walker 1993). En un meta-análisis de estos datos se concluye que el uso de la píldora anticonceptiva oral no tiene influencia en el riesgo global de padecer AR, pero sí que puede retrasar la aparición de la enfermedad (Spector and Hochberg 1990).

1.1.3.3 Las infecciones

Se ha intentado implicar a diferentes agentes infecciosos en la patogenia de la AR dada la mayor frecuencia de serologías virales positivas en estos pacientes. Como hipótesis para explicar esta teoría se ha propuesto la activación repetida de la inmunidad innata a través de los receptores toll-like (TLRs) o el mimetismo molecular. Sin embargo en los estudios publicados no se han obtenido resultados concluyentes (Roudier et al. 1988; Schrijver et al. 2000). Probablemente estos agentes infecciosos en un contexto de predisposición genética y conjuntamente con otros factores de riesgo, puedan tener alguna implicación en la etiopatogenia de la enfermedad.

En distintos trabajos se ha estudiado el papel de diferentes gérmenes en la etiopatogenia de la AR: el Virus Epstein Bar, el retrovirus, la rubeola, el parvovirus B19, micobacterias, micoplasmas o determinadas bacterias entéricas o cutáneas (Schrijver et al. 2000; Scher and Abramson 2011; Roudier et al. 1988). Uno de los gérmenes que recientemente ha sido estudiado por su mayor prevalencia en pacientes con AR es el causante de la periodontitis, la *Porphyromonas gingivalis* (de Pablo, Dietrich, and McAlindon 2008). Esta bacteria es capaz de producir péptidos citrulinados in vivo, lo que apoya a la teoría de que en pacientes con periodontitis secundaria a ésta bacteria que sean portadores del EC, se promueve la formación de anticuerpos ACPA, y esto puede contribuir en el desarrollo de la AR.

1.1.3.4 El tabaquismo

Múltiples estudios (Hazes et al. 1990; Hernández Avila et al. 1990; Symmons et al. 1997; E W Karlson et al. 1999) han relacionado el efecto del tabaco con el desarrollo de la AR, y su interacción con factores genéticos, el EC y los autoanticuerpos. Existe la hipótesis de que este mayor riesgo de padecer AR en pacientes con hábito tabáquico y EC podría deberse a la citrulinación de proteínas en tejidos inflamados. Un estudio publicado el año 2006 (Klareskog et al. 2006), encuentra asociación entre presentar el EC, ser portador de ACPAs y ser fumador. Sin embargo, los resultados de los estudios sobre la relación del tabaquismo con la gravedad de la enfermedad son ambiguos. En varios estudios transversales se han encontrado asociaciones significativas entre el tabaquismo y las lesiones articulares en las radiografías, la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. En otros estudios no se ha encontrado el efecto del tabaquismo actual o antiguo, lo que apuntaría al papel más relevante del tabaquismo en el inicio de la AR que en la perpetuación del proceso erosivo articular.

1.1.3.5 El nivel socioeconómico y la ocupación

Los datos con respecto a la asociación entre la situación socioeconómica y la AR son variados. Los estudios más recientes demuestran una asociación inversa entre el nivel socioeconómico medido por la educación y la clase ocupacional y el riesgo de AR (Bengtsson et al. 2005). Se ha descrito un riesgo dos veces inferior de padecer AR en individuos con mayor grado de educación en comparación con aquellos que tienen un nivel más bajo. Estos resultados concuerdan con un estudio basado en la población de Suecia, donde el riesgo de AR en sujetos sin títulos universitarios era 40% mayor en comparación con los que tenían títulos universitarios. Para los sujetos cuya ocupación requiere trabajo manual, el riesgo fue 20% mayor que el de los trabajadores no manuales (Bengtsson et al. 2005).

1.1.3.6 Los autoanticuerpos

Anticuerpos anticitrulina

Se ha descrito que la interacción de factores ambientales junto con la susceptibilidad genética personal puede conducir a modificaciones post-traduccionales en diferentes proteínas, como la llamada citrulinación (McInnes and Schett 2012). La citrulinación se caracteriza por la conversión de un residuo de arginina a citrulina, catalizada por la enzima peptidil arginina desaminasa (PAD). Se conocen 5 isoformas de PAD. La expresión de PAD4 se asocia con el desarrollo de manifestaciones clínicas en AR (Nielen et al. 2004; X. Chang et al. 2005).

Asimismo, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra proteínas citrulinadas, junto con la expresión de PAD4, preceden a la aparición de la inflamación y la formación de moléculas de adhesión en la sinovial, lo que indica que tal vez se requiere un "segundo estímulo" para involucrar la membrana sinovial en la AR (Nielen et al. 2004). Se ha descrito incluso, que la aparición de factor reumatoide (FR) y ACPA puede preceder al desarrollo clínico de AR hasta en unos 15 años (Majka et al. 2008).

Factor reumatoide

El factor reumatoide (FR) consiste en anticuerpos dirigidos contra la fracción constante (Fc) de la inmunoglobulina IgG humana (Chen, Fong, and Carson 1987). Es el sello distintivo de la AR y se pueden detectar entre el 60 y el 80% de los pacientes (Chen, Fong, and Carson 1987). El FR se incluyó en los criterios de laboratorio 1987 por la *American Rheumatism Association* (ARA). Sin embargo, el FR no es específico para la AR y se encuentra en otras enfermedades reumáticas, otros trastornos inflamatorios crónicos, infecciones e incluso en personas sanas (Aho, Palusuo, and Kurki 1994; Lane and Gravel 2002). La sensibilidad para el factor reumatoide en la AR varía desde el 19 hasta 53% y la variación en la especificidad es del 91,7 a 98,6% (Nakamura 2000). El FR se utiliza para el diagnóstico y pronóstico de la AR y varios estudios han demostrado que se correlaciona con resultados radiográficos (Nakamura 2000; Emery 1997; Goronzy et al. 2004; Tedesco et al. 2009). Su valor predictivo depende de la etapa de la enfermedad (Aho, Palusuo, and Kurki 1994; Emery 1997; Valdimarsson and Jónsson 1996). Por lo tanto, en las primeras etapas de la AR, la positividad del FR se asocia con enfermedad más activa y el desarrollo de erosiones. Sin embargo, en fases posteriores de la enfermedad, predice menos la progresión posterior (Nakamura 2000; Emery 1997).

1.1.4. ANATOMÍA PATOLÓGICA

La membrana sinovial de las articulaciones, está formada por tejido conectivo constituido por algunas células, adipocitos, fibroblastos y capilares aislados; esporádicamente se pueden encontrar infiltrados algún macrófagos o linfocitos, pero en número muy bajo. La cara interna de la membrana sinovial, la que está en contacto con la cavidad, está formada por una pequeña capa avascular de células llamadas sinoviocitos. Los sinoviocitos se pueden clasificar en los de tipo A, con características parecidas a los macrófagos; y los tipo B, con características parecidas a los fibroblastos (Edwards et al. 1982).

El tejido sinovial de los pacientes con AR tiene una estructura y características muy diferentes al tejido normal. En la AR, destaca el edema y la proliferación del tejido sinovial que forma

copiosos pliegues y vellosidades (Klippel JH, Dieppe PA 1994). Este aumento de volumen está generado por la hiperplasia de los sinoviocitos, la angiogénesis y la migración de células inflamatorias a la membrana sinovial.

Según el tiempo de evolución de la AR, las características de la membrana sinovial pueden modificarse. Inicialmente predomina el edema intersticial y la angiogénesis, con una infiltración leucocitaria y la hiperplasia sinovial menos marcadas. Con el tiempo, probablemente debido a la proliferación de los sinoviocitos, aumenta la hiperplasia de sinoviocitos, pudiendo estar formada hasta por más de diez capas; asimismo, aumenta también el infiltrado inflamatorio formado por linfocitos T y B, células plasmáticas y macrófagos (Figura 2).

Se ha descrito también, aunque es muy poco frecuente, una fibrosis de la membrana sinovial a expensas de una proliferación de fibroblastos con un escaso infiltrado inflamatorio, sobretodo en AR de larga evolución (Klippel JH, Dieppe PA 1994).

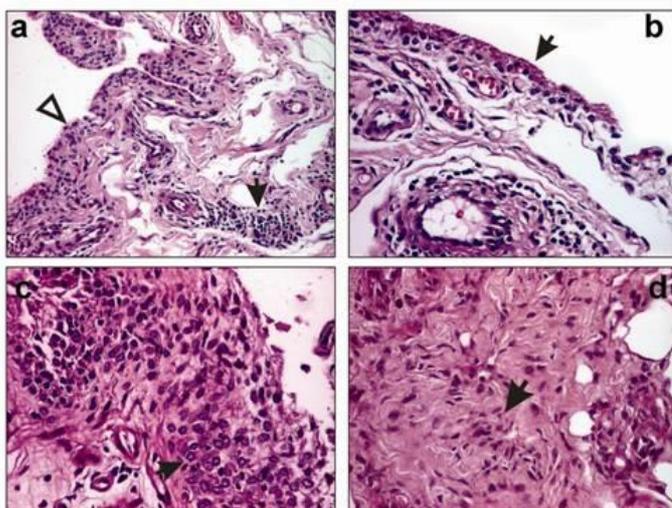


Figura 2. Biopsia sinovial en Artritis Reumatoide: a) Proliferación de los sinoviocitos que recubren la membrana sinovial (triángulo blanco), infiltrado inflamatorio perivascular (flecha negra). HE tinción X100; b) Necrosis fibrinoide (flecha negra) de los sinoviocitos. Tinción HE, X200; c) Empaladiza de sinoviocitos formando más de 6 capas (flecha negra). Tinción ing, X200; d) Fibroblastos sinoviales (flecha negra), tinción HE, X200. Imagen extraída del artículo: Rosu, et al. J Med Life. 2008 Jul-Sep;1(3):287-94

1.1.5. FISIOPATOLOGÍA

La AR se caracteriza por una reacción inflamatoria en la membrana sinovial que puede hacerse crónica y provocar la destrucción del cartílago y huesos articulares (Arend 1997; Sewell and Trentham 1993; Koopman WJ 1996).

Los factores etiológicos de la AR son poco conocidos. La angiogénesis es una de las primeras reacciones que se observa en la sinovia inflamada, la cual es imprescindible para la formación de nuevo tejido (Szekanecz and Koch 2010). Asimismo, a parte de la hiperplasia sinovial, se observa un aumento de líquido sinovial, lo que provoca un aumento de presión que contribuye

a la situación de hipoxia tisular. Dicha hipoxia, producirá un aumento de transcripción del factor de hipoxia inducible-1 y consecuentemente del factor de crecimiento endotelial y de sus receptores. Mientras se va produciendo el mecanismo de angiogénesis se produce también un fenómeno de migración celular gracias a la activación y expresión de moléculas de adhesión como E-selectina y a moléculas de adhesión intercelular endotelial y vascular (ICAM o VCAM) (McInnes and Schett 2012; van de Sande et al. 2011). La activación de estas moléculas de adhesión, permiten la diapédesis y la infiltración de diversas células inflamatorias, como los linfocitos Th17, células dendríticas, macrófagos y linfocitos B a la membrana sinovial (Miossec, Korn, and Kuchroo 2009).

La angiogénesis, liberación de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de señalización intracelular y la migración celular junto con factores subyacentes asociados con la activación inmune, implican a las vías inmunitaria adaptativa e innata y conducen a la activación en cascada de la misma y a la destrucción articular (McInnes and Schett 2012) (Figura 3).

- Linfocitos T

El 30-50 por ciento de las células de la membrana sinovial son linfocitos T, las células mononucleares más abundantes. La mayoría son del tipo CD4+, y éstos pueden distribuirse de diferentes maneras en la membrana sinovial.

Las células T requieren de dos señales de activación. La primera señal es la unión antígeno-específica, y la segunda señal o señal co-estimuladora, se caracteriza por la interacción de los receptores CD80/86 en las células dendríticas y el CD28 en la célula T (McInnes and Schett 2012; Huppa and Davis 2003). El bloqueo de la señal co-estimuladora a través de la inhibición competitiva de CD80/86 previene la activación de células T y de sus efectos secundarios (producción de inmunoglobulinas, activación de monocitos y diferenciación de las células dendríticas). Cuando se produce la activación de las células T, las células T helper (Th: Th0, Th1, Th17) son reclutadas. La mayoría de las células T CD4+, se clasifican en los subtipos Th1 y Th2. En condiciones normales, los Th1 segregan interferón- γ (IFN- γ) como defensa frente a las bacterias intracelulares y; la secreción de la interleucina-4 (IL-4) por parte de los Th2 combate a los parásitos extracelulares. Recientemente se han comenzado a caracterizar adecuadamente dos nuevos subtipos de linfocitos CD4: los Th17 y los linfocitos reguladores (Tr).

Hoy en día se piensa que los linfocitos Th17 intervienen significativamente en la inflamación autoinmune. La diferenciación de este tipo celular requiere de diferentes citoquinas como TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23, secretadas por las células dendríticas y macrófagos reclutados.

Los Th 17 pueden producir IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22, TNF- α y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). La IL-17A trabaja con TNF- α para promover la activación de fibroblastos y condrocitos, y conjuntamente con otras citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 o el TNF- α estimulan la aparición y activación de los osteoclastos que serán responsables de las erosiones típicas de la AR (Schett 2007). La IL-17 tiene efectos pleotrópicos y actúa sobre gran variedad de tipos celulares. La IL-17 perpetua la inflamación local y promueve la angiogénesis, la osteoclastogénesis y, en último extremo, la destrucción del cartílago y el hueso.

- Linfocitos B y células plasmáticas.

En el tejido sinovial de los pacientes con AR, conjuntamente con las células T y algunas células plasmáticas, también podemos encontrar linfocitos B en forma de agregados (Tak et al. 1997; Klippel JH, Dieppe PA 1994). En los últimos años se ha reconocido la importancia de los linfocitos B en la patogenia de la AR. Con frecuencia los autoanticuerpos circulantes preceden al inicio de la AR, implican la activación inicial de los linfocitos B y su diferenciación a células plasmáticas. Lejos de ser simplemente fabricantes de anticuerpos, cada vez es más patente que los linfocitos B intervienen en muchas facetas de la respuesta inmune: incluyen la presentación de antígenos a las células T, la estimulación de los fibroblastos sinoviales a través de la secreción de citoquinas (por ejemplo, linfotoxina- β [Lt- β] y TNF) y, el reclutamiento de las células dendríticas. Además, los linfocitos B, también participan en la linfoangiogénesis y la neogénesis (Calero, Nieto, and Sanz 2010; Lemoine et al. 2009; Isaacs 2010).

Las células plasmáticas también están involucradas en la producción de autoanticuerpos, la presentación autoantígeno, y la producción de citoquinas incluidas IL-6, TNF- α , y Lt- β (McInnes and Schett 2012; Rasheed and Haqqi 2008).

- Citoquinas inflamatorias

Las citosinas inflamatorias son mediadores de enfermedad activa, potencian el reclutamiento y la activación del sistema inmune adaptativo e inducen la secreción por parte de los fibroblastos sinoviales de metamieloproteasas que degradan el cartílago. Los pacientes con artritis de inicio (síntomas de menos de 3 meses de duración) que evolucionan a AR muestran un perfil de citocinas en la membrana sinovial diferente de los pacientes en estado de remisión clínica o que presentan otras artropatías. Los pacientes propensos a desarrollar AR muestran altas concentraciones de las citocinas IL-1, IL-4 e IL-13, IL-17 segregadas por los linfocitos T y de las células estromales y EGF, β -FGF, IL-1 e IL-15 procedentes de los macrófagos.

- Células dendríticas

Las células dendríticas actúan como células presentadores de antígenos en el líquido y en la membrana sinovial. La membrana sinovial está infiltrada por diversos tipos de células inflamatorias, que en última instancia trabajan juntos para causar destrucción (McInnes and Schett 2012). Las células dendríticas expresan citoquinas, moléculas HLA de clase II y moléculas coestimuladoras (CD80/86), y están involucrados en la presentación del antígeno para la activación de células T.

Existe la hipótesis de que las células dendríticas podrían entrar en contacto con diferentes antígenos en la sinovia y dirigirse a los tejidos linfoides secundarios. Mediante estas acciones podrían participar así en el desarrollo de la AR (Thomas and Lipsky 1996).

- Células del sistema inmune innato,

Las células del sistema inmune innato (macrófagos, mastocitos, y células “*natural killers*”) también son importantes en la fisiopatología de la inflamación sinovial en la AR. La maduración de macrófagos está mediada por factor estimulante de colonias granulocitos y de granulocitos y macrófagos (G-CSF y GM-CSF). Los macrófagos son activados por TLRs y por “NOD-like receptors” (NLRs) y secretan diferentes citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23) que están involucradas en la liberación de enzimas de degradación de la matriz, la fagocitosis y la presentación de antígenos. Los fibroblastos sinoviales son inicialmente activados por el microambiente local y posteriormente adquieren un fenotipo pseudomaligno al expresar niveles alterados de citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, metaloproteinasas de la matriz, e inhibidores tisulares de metaloproteinasa, que median el proceso inflamatorio crónico y catalizan la destrucción articular (S. K. Chang, Gu, and Brenner 2010).

Asimismo existen otras vías de transducción de señales intracelulares involucrados en la patogénesis de la AR y que contribuyen en la respuesta inflamatoria, como la vía de Janus quinasa (JAK), proteínas quinasas activada por mitógeno (MAPKs), c-Jun N-terminal quinasa , factor nuclear kB (NF- κ B), y del receptor activador del factor nuclear kappa- β ligando (RANKL) (McInnes and Schett 2012; Rasheed and Haqqi 2008). Además, se ha descrito que RANKL y el factor estimulante de colonias de macrófagos promueven la diferenciación de los osteoclastos y la invasión del cartílago articular (McInnes and Schett 2012).

La etiopatogenia de la hiperplasia sinovial resultante no se conoce por completo, pero se sabe que estos fibroblastos sinoviales contribuyen en la destrucción local del cartílago, en la

inflamación sinovial, y en la supervivencia de las células T y B. Además, son resistentes a la apoptosis, posiblemente a través de mutaciones del gen supresor tumoral P53, la modulación del retículo endoplásmico, y la activación inducida por citoquinas de NF-kappaβ, que favorece la supervivencia de éstos sinoviocitos en presencia del ligando del TNF-α receptor.

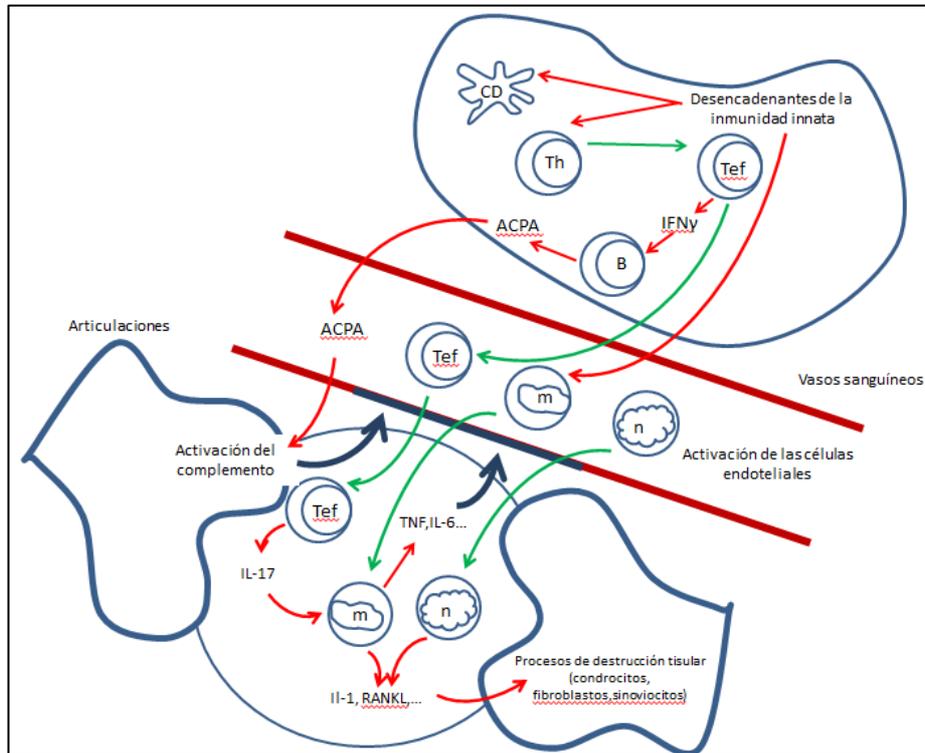


Figura 3. Fisiopatología de la artritis reumatoide. Las interacciones de coestimulación dependiente de entre las células dendríticas, células T y células B, ocurren principalmente en el ganglio linfático; estas interacciones provocan una respuesta autoinmune que promueve la citrulinación de proteínas propias. En la membrana sinovial y la médula ósea adyacente, las vías inmunitarias innata y adaptativa se integran para promover la remodelación de tejidos y daños. Bucles de retroalimentación positivos mediados por las interacciones entre leucocitos, fibroblastos sinoviales, condrocitos, y los osteoclastos, junto con los productos del daño molecular, conducen hacia la fase crónica de la patogénesis en la artritis reumatoide. Tef: Linfocitos T efectores, B: Linfocitos B, Th: Linfocitos T helper, M: Macrófagos, N: Neutrófilos, ACPA: Anticuerpos anti citrulina, CD: Célula dendrítica. Imagen adaptada del artículo: Luros et al, Immunology 2002;103:407-416.

1.1.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El inicio de la AR suele ser insidioso. El dolor, la rigidez matutina, y la inflamación poliarticular son los síntomas predominantes (D. M. Lee and Weinblatt 2001). Típicamente, afecta a las articulaciones metacarpofalángicas, interfalángicas proximales de los dedos, las muñecas y la articulaciones metatarsfalángica de los pies. Otras articulaciones sinoviales de los miembros superiores e inferiores, como los codos, hombros, tobillos y rodillas, también están comúnmente afectados (Fleming, Crown, and Corbett 1976; Jacoby, Jayson, and Cosh 1973).

Una característica común de las personas con AR activa es la rigidez matutina, que se puede definir como "la lentitud o dificultad para mover las articulaciones al levantarse de la cama o después de permanecer en una posición demasiado tiempo, que afecta a ambos lados del cuerpo y mejora con el movimiento" (Lineker et al. 1999). La rigidez matutina que dura más de una hora refleja la gravedad de la inflamación articular. A pesar de que ocurre rara vez en enfermedades distintas de la AR, la rigidez matutina, o rigidez después de cualquier período prolongado de inactividad, también se ha descrito en otras artropatías inflamatorias (Edworthy 1999).

En algunos pacientes el inicio de la AR puede ser episódico, con una a varias articulaciones afectadas de forma secuencial durante horas o días, que pueden alternar con períodos sin síntomas. Este patrón episódico se conoce como "reumatismo palindrómico" (Maksymowych et al. 2002). Según los estudios publicados, la proporción de pacientes con reumatismo palindrómico que desarrollarán AR varía entre el 30 y el 60% (Koskinen, Hannonen, and Sokka 2009; Maksymowych et al. 2002). Se ha sugerido que la presencia de ACPA puede predecir la progresión del reumatismo palindrómico a AR (Gonzalez-Lopez et al. 2000).

Con menor frecuencia, la AR también puede debutar como una monoartritis crónica que afecta a una articulación grande, como la muñeca, la rodilla, el hombro, la cadera o el tobillo. El intervalo entre monoartritis y poliartritis puede extenderse desde días a varias semanas en pacientes cuya enfermedad progresa.

Una proporción de pacientes presentan síntomas extraarticulares persistentes que pueden preceder a la aparición de la poliartritis. Los síntomas extraarticulares incluyen: dolor generalizado, rigidez, síntomas del síndrome del túnel carpiano bilateral, pérdida de peso, depresión, y fatiga (simulando síndrome de fatiga crónica). Asimismo, con menor frecuencia, los pacientes pueden presentar enfermedad extraarticular en ausencia de artritis clínica.

1.1.6.1 Enfermedad articular

Son frecuentes el dolor y la inflamación de las articulaciones, especialmente de las pequeñas articulaciones de las manos, muñecas y dorso de pies, aunque todas las articulaciones periféricas y, en menor medida, las articulaciones más proximales de las extremidades pueden estar afectadas. El esqueleto axial generalmente no está involucrado, a excepción de columna cervical, donde la enfermedad grave puede causar grave compromiso neurológico, generalmente en pacientes con enfermedad de larga evolución. Los pacientes con enfermedad

mal controlada suelen experimentar un daño articular progresivo, lo que puede provocar deformidades articulares significativas y funcionales.

La característica clave de la inflamación inicial es el dolor e inflamación de las articulaciones afectadas. La inflamación se demuestra por sensibilidad local a la presión aplicada sobre la articulación o por el dolor al mover la misma. El aumento de volumen puede ser debido a la hipertrofia o al derrame sinovial asociado. Las deformidades articulares características son manifestaciones tardías de la enfermedad que resultan de las tensiones físicas y daños en la anatomía local del articulaciones afectadas.

La AR afecta las articulaciones periféricas en casi todos los pacientes. La participación axial y de articulaciones centrales son menos frecuente y ocurre del 20 al 50% de los pacientes; tales articulaciones incluyen las articulaciones facetarias y atlantoaxoideas del cuello; la acromioclavicular (Lehtinen et al. 1999), esternoclavicular, temporomandibular, articulaciones cricoaritenoides, hombros y las caderas.

La implicación simétrica de las articulaciones es un rasgo característico, aunque esto puede ser menos aparente en la enfermedad temprana. Asimismo, la deformidad articular en ocasiones puede ser asimétrica, dato que puede ser atribuido a un aumento de daño estructural en las articulaciones relacionadas con el uso excesivo de la extremidad dominante. Las deformidades articulares características aparecen en la AR crónica más establecida o tardía, e incluyen la desviación cubital, los dedos en “cuello cisne” y en “Boutonniere” (Figura 4).



Figura 4. Fotografía de las manos de un paciente con AR de años de evolución. Observe la desviación cubital de las articulaciones metacarpofalángicas.

La clínica articular puede ir asociada a disminución de la fuerza de agarre, edema con fovea en el dorso de la mano y síndrome del túnel carpiano.

1.1.6.2 Manifestaciones extraarticulares

La mayoría de pacientes con manifestaciones extraarticulares tienen una enfermedad grave y de larga evolución. Las manifestaciones extraarticulares incluyen: anemia, fatiga, nódulos subcutáneos ("reumatoides"), vasculitis, pleuropericarditis, esplenomegalia, síndrome de Sjögren, y otros. Asimismo, los síntomas y hallazgos de manifestaciones sistémicas pueden incluir dolor generalizado, rigidez, pérdida de peso, depresión y fatiga.

1.1.7. HALLAZGOS DE LABORATORIO

En la sangre periférica y el líquido sinovial de los pacientes con AR podemos objetivar diferentes alteraciones que reflejan la presencia de la inflamación sistémica, intraarticular y las características autoinmunes de la enfermedad; éstos hallazgos incluyen el líquido articular inflamatorio, la anemia característica de trastornos crónicos, la presencia FR y de ACPA, y la evidencia de reactantes de fase aguda que tiende a correlacionarse con el grado de actividad de la enfermedad.

El examen del líquido sinovial en las articulaciones afectadas por AR suele revelar un derrame tipo inflamatorio, con un recuento de leucocitos entre 1.500 y 25.000/mm³ que se caracteriza por un predominio de células polimorfonucleares (Dougados 1996). En la enfermedad muy activa puede observarse recuentos celulares de más de 25.000 células, pero niveles superiores de 25.000 deben alertar al clínico de la posibilidad de una infección coexistente (Kortekangas et al. 1992; Krey and Bailen 1979). Otros hallazgos adicionales en el estudio del líquido sinovial son niveles bajos de glucosa, de C3 y de complemento C4, pero estas pruebas generalmente no se obtienen en la práctica clínica, ya que rara vez son útiles.

Las alteraciones hematológicas más comunes asociados con la enfermedad activa incluyen: anemia de trastornos crónicos, trombocitosis, y ocasionalmente una leucocitosis leve. Asimismo, se ha descrito un aumento del riesgo de enfermedad linfoproliferativa, incluyendo de linfoma no Hodgkin.

Cerca del 75 a 80 % de los pacientes con AR presentan FR, ACPA, o ambos en sangre periférica. La presencia de los anticuerpos tiene implicaciones diagnósticas, terapéuticas y pronósticas. Alrededor de un cuarto a un tercio de los pacientes tienen anticuerpos antinucleares positivos.

Los reactantes de fase aguda como la velocidad de sedimentación globular (VSG) y los niveles de proteína C reactiva (PCR), están generalmente elevados en los pacientes con enfermedad activa, y el grado de elevación se suele correlacionar con la actividad de la enfermedad.

1.1.8. DIAGNOSTICO. CRITERIOS CLASIFICATORIOS

La AR no dispone de criterios de diagnóstico como tal. Sin embargo existen diferentes criterios clasificatorios que ayudan al clínico en el diagnóstico. El objetivo de los criterios clasificatorios es poder discriminar de forma estandarizada en una población de personas con sinovitis indiferenciada cuál es el subgrupo que con mayor probabilidad va a desarrollar una AR erosiva y persistente, con el fin de ser incluida en ensayos clínicos u otros estudios que necesiten criterios uniformes. Sin embargo, un especialista puede diagnosticar AR a un paciente aunque no cumpla criterios o tenga manifestaciones no incluidas en los mismos.

Hasta hace relativamente poco tiempo, los criterios clasificatorios más utilizados han sido los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) publicados el año 1987. Actualmente los criterios que se utilizan son los criterios de clasificación de la Liga Europea contra el Reumatismo y el Colegio Americano de Reumatología (EULAR/ACR) publicados el año 2010 (Aletaha, Neogi, Silman, Funovits, Felson, Bingham, Birnbaum, Burmester, Bykerk, Cohen, Combe, Costenbader, Dougados, Emery, Ferraccioli, Hazes, Hobbs, Huizinga, Kavanaugh, Kay, Kvien, Laing, Mease, Ménard, Moreland, Naden, Pincus, Smolen, Stanislawska-Biernat, Symmons, Tak, Upchurch, Vencovsky, et al. 2010).

Previamente, en 1987, la ACR publicó un conjunto de criterios basados en su capacidad para diferenciar entre pacientes con AR establecida y pacientes con otras enfermedades reumáticas de similar duración (artrosis, lupus eritematoso sistémico, fibromialgia y otras) (Arnett et al. 1988) (Tabla 1). Estos criterios fueron bien aceptados como punto de partida para la definición de la enfermedad, y para intentar discriminar pacientes con AR establecida de aquellos que padecían otra enfermedad reumática; sin embargo, fueron criticados por su poca sensibilidad para diagnosticar AR en estadios precoces, precisamente el momento en el que los pacientes se pueden beneficiar más del tratamiento. Motivo por el cual el año 2010, ACR y EULAR organizaron un grupo de trabajo conjunto con el fin de desarrollar unos nuevos criterios para identificar a los pacientes en estadios iniciales de la enfermedad (Aletaha, Neogi, Silman, Funovits, Felson, Bingham, Birnbaum, Burmester, Bykerk, Cohen, Combe, Costenbader, Dougados, Emery, Ferraccioli, Hazes, Hobbs, Huizinga, Kavanaugh, Kay, Kvien, Laing, Mease,

Ménard, Moreland, Naden, Pincus, Smolen, Stanislawska-Biernat, Symmons, Tak, Upchurch, Vencovský, et al. 2010).

Tabla 1. Criterios de clasificación de la artritis reumatoide de la ACR (1987)

Criterio diagnóstico		Descripción
1	Rigidez matutina	Rigidez matutina articular que dura al menos 1 hora.
2	Artritis de 3 o más articulaciones	Al menos 3 grupos articulares deben estar inflamados simultáneamente y ser objetivados por un médico. Los 14 grupos articulares son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas.
3	Artritis de manos	Al menos una articulación de las manos debe estar inflamada (carpo, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales)
4	Artritis simétrica	Afección simultánea del mismo grupo articular (definido en el criterio 2) en ambos lados del cuerpo.
5	Nódulos Reumatoides	Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, superficies de extensión o en zonas yuxta-articulares observados por un médico.
6	Positividad de factor reumatoide	Presencia de valores elevados de factor reumatoide por cualquier método con un resultado en controles inferior al 5%.
7	Cambios radiográficos	Alteraciones radiológicas típicas de artritis reumatoide en radiografías postero-anteriores de las manos. Debe existir erosión u osteoporosis yuxtaarticular clara y definida en articulaciones afectadas.

Nota: Podemos clasificar a un paciente como AR si cumple como mínimo 4 de estos criterios (los criterios clínicos han de estar presentes como mínimo 6 semanas. Tabla extraída del artículo: Arnett FC, et al. Arthritis Rheum. 1988 Mar;31(3):315-24.

Los criterios EULAR/ACR de 2010 clasifican una enfermedad como AR definida si se muestra sinovitis en al menos una articulación en ausencia de otro diagnóstico que lo justifique y una puntuación de 6 o mayor en cuatro dominios que incluyen: número y lugar de afección articular, anormalidades serológicas, elevación de reactantes de fase y duración de la sintomatología (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios de clasificación de la EULAR / ACR de 2010

<p>Los nuevos criterios de AR sólo se aplicarán a una determinada población diana que debe tener las siguientes características:</p> <p>1) Presentar al menos 1 articulación con sinovitis clínica (al menos una articulación inflamada) y que dicha sinovitis no pueda explicarse por el padecimiento de otra enfermedad.</p> <p>2) Tener una puntuación igual o superior a 6 en el sistema de puntuación que se presenta a continuación</p>	
<p>Afección articular</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 articulación grande afectada • 2-10 articulaciones grandes afectadas • 1-3 articulaciones pequeñas afectadas • 4-10 articulaciones pequeñas afectadas • 10 articulaciones pequeñas afectadas 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>5</p>
<p>Serología</p> <ul style="list-style-type: none"> • FR y ACPA negativos • FR y/o ACPA positivos bajos (< 3 VN) • FR y/o ACPA positivos alto (> 3 VN) 	<p>0</p> <p>2</p> <p>3</p>
<p>Reactantes de fase aguda</p> <ul style="list-style-type: none"> • VSG y PCR normales • VSG y/o PCR elevadas 	<p>0</p> <p>1</p>
<p>Duración</p> <ul style="list-style-type: none"> • <6 semanas • ≥6 semanas 	<p>0</p> <p>1</p>

ACPA: anticuerpos contra péptidos citrulinados; FR: factor reumatoide; PCR: proteína C reactiva; VN: valor normal; VSG: velocidad de sedimentación globular. Tabla extraída del artículo: Aletaha, et al. Arthritis Rheum. 2010 Sep;62(9):2569-81.

1.1.9. EVALUACIÓN DE LA ENFERMEDAD

1.1.9.1. Parámetros que evalúan el grado de actividad

Tanto en la evaluación inicial como las visitas de seguimiento de la AR se debe realizar una valoración sistemática de un conjunto mínimo de parámetros que permitan evaluar el grado de actividad inflamatoria, de discapacidad funcional y de daño estructural residual. El seguimiento de los pacientes mediante estos parámetros aporta indudables ventajas (Wolfe and Pincus 1999; Pincus 1996) (Tabla 3).

Tabla 3. Conjunto mínimo de parámetros para evaluación de la AR recomendados por OMERACT 1993 (Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials).

- 1) Número de articulaciones dolorosas
- 2) Número de articulaciones tumefactas
- 3) Dolor
- 4) Evaluación global de la enfermedad realizada por el enfermo
- 5) Evaluación global de la enfermedad realizada por el médico
- 6) Reactantes de fase aguda
- 7) Capacidad funcional física
- 8) Daño radiológico (AR de más de 1 año de evolución)

1.1.9.2. Índices de actividad compuestos

Se han publicado diferentes índices compuestos cuya validez fue revisada en el marco de la conferencia OMERACT (*The Journal of Rheumatology* 1993). Los índices difieren en el número de parámetros incluidos, así como en los métodos utilizados para su cálculo. Sus ventajas respecto a la evaluación convencional con parámetros aislados son evitar la duplicidad y aumentar la sensibilidad al cambio. Sus inconvenientes son cierta complejidad de cálculo, la dificultad de interpretación y algunos problemas relacionados con su construcción.

Merece una especial atención el índice "Disease arthritis score" (DAS) (van der Heijde et al. 1992; van der Heijde et al. 1990); este índice incluye el índice de Ritchie (IR), el número de articulaciones tumefactas sobre 44 articulaciones (NAT44), la VSG y la evaluación global de la salud según el paciente (EVAg) sobre una escala visual analógica (para la realización del DAS el rango de EVAg es de 0 a 100). El cálculo del DAS se realiza a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{DAS} = 0,54(\sqrt{\text{IR}}) + 0,065(\text{NAT44}) + 0,33(\text{InVSG}) + 0,0072(\text{EVAg}).$$

Existe un DAS modificado basado en los recuentos de 28 articulaciones dolorosas (NAD28) y tumefactas (NAT28) que es mucho más útil en la práctica clínica y que recomiendan las diferentes guías y organizaciones (Prevo et al. 1995). La fórmula del DAS28 es la siguiente:

$$\text{DAS28} = 0,56(\sqrt{\text{NAD28}}) + 0,28(\sqrt{\text{NAT28}}) + 0,70(\text{InVSG}) + 0,014(\text{EGP}).$$

Los valores del DAS y DAS28 varían entre 0 y 10 y son la base de los criterios de mejoría de la EULAR (van Gestel et al. 1996).

Existe otro índice compuesto que, por su simplicidad y fácil cálculo, está siendo cada vez más utilizado, el SDAI (Simplified Disease Activity Index) (J S Smolen et al. 2003). Este índice tiene la ventaja de que no necesita una fórmula matemática compleja para su determinación, sino que se calcula mediante una simple suma aritmética del número de articulaciones dolorosas y tumefactas, con índices reducidos de 28 articulaciones, valoración de la actividad por el paciente y el médico (medidos de 0 a 10) y la concentración de PCR en mg/dl. La inclusión de la PCR en vez de la VSG se basa en que la primera es una medida de inflamación más precisa que la segunda, se ha relacionado con el daño estructural de manera más consistente y que está menos influida por otras variables como la anemia o el FR (Aletaha, Nell, et al. 2005).

Del mismo modo que sucede con el DAS, existen modificaciones del SDAI, en particular un índice en el que no se incluye la PCR, hecho que facilita la evaluación de la actividad en aquellos casos en el que no se pueda disponer de resultados de PCR. Éste índice es conocido como "Clinical Disease Activity Index" (CDAI) (Aletaha, Ward, et al. 2005) y su cálculo se realiza según la fórmula siguiente:

$$\text{SDAI} = \text{NAD28} + \text{NAT28} + \text{EVA g} + \text{EVAm} + \text{PCR (mg/dl)}.$$

Para mejorar la interpretación de éstos índices es preciso establecer unos límites para poder clasificar a los pacientes en niveles de actividad diferentes. La categorización en clases según la actividad es importante para proponer iniciar, o cambiar un tratamiento (en caso de actividad alta o moderada) o para definir objetivos terapéuticos (actividad baja o remisión).

1.1.9.3. Clasificación del grado de actividad inflamatoria

La actividad inflamatoria puede variar según el paciente, el momento evolutivo o la respuesta al tratamiento. Clásicamente se pueden diferenciar 4 tipos de actividad inflamatoria: remisión, actividad baja, moderada o alta. Para clasificar en alguna de estas fases se han desarrollado diferentes criterios, entre ellos los de remisión clínica del ACR, y los criterios de remisión clínica y de actividad inflamatoria basados en índices.

- Criterios de remisión clínica del ACR: La ACR establece 6 criterios para evaluar la remisión clínica de la AR (Tabla 4). La presencia de al menos 5 de estos criterios durante 2 meses o más es suficiente para identificar a un paciente en remisión completa, con una sensibilidad del 72 al 80% y una especificidad del 96 al 100 por ciento (Pinals, Masi, and Larsen 1981; Wolfe and Hawley 1985). Los valores predictivos de estos criterios pueden variar en diferentes poblaciones (Alarcón et al. 1987). Sus principales inconvenientes son la ausencia de especificaciones sobre cómo medirlos, su valor dicotómico (lo que puede cambiar la clasificación con pequeñas modificaciones en la actividad clínica de la enfermedad), y que dos de los criterios (cansancio y rigidez matutina) no forman parte de los parámetros recomendados para evaluar pacientes con AR (Wolfe et al. 1999; Tugwell and Boers 1993; van Riel 1992; Boers et al. 1994; Felson 1993).

Tabla 4. Criterios ACR de remisión clínica de AR

1) Rigidez matutina ausente o no superior a 15 minutos
2) Ausencia de cansancio
3) Ausencia de dolor articular en la anamnesis
4) Ausencia de dolor articular a la presión
5) Ausencia de tumefacción sinovial y tenosinovial
6) Velocidad de sedimentación

*La ACR considera remisión clínica se cumplen al menos 5 de los 6 criterios.

- Clasificación de la actividad inflamatoria basada en índices: Para definir los puntos de corte que separaban las categorías anteriores se empleó la cohorte original de la que derivó el DAS, en la que se había separado a los pacientes con actividad alta o baja según la decisión del reumatólogo de empezar o no el tratamiento. Para disminuir la superposición de las 2 distribuciones, se escogió como límite inferior de la actividad alta el percentil 25 y de la actividad baja el percentil 75. La actividad moderada se definió como el intervalo que quedaba entre las otras 2 (van Gestel et al. 1996). Los puntos de corte que separaban las 3 categorías eran $DAS < 2,4$ para la actividad baja, $DAS > 3,7$ para la actividad alta y $2,4 < DAS < 3,7$ para la actividad moderada. Igual que para la remisión, basándose en los valores del DAS se extrapolaron los valores para el DAS28 que son de $DAS28 < 3,2$ para la actividad baja y

DAS28>5,1 para la alta (van Riel and van Gestel 2000). Con el SDAI, los puntos de corte se definieron en la publicación original y tomaron como referencia los valores del DAS28. Se definieron como: SDAI<11 para la actividad baja y SDAI >40 para la actividad alta. Recientemente se ha propuesto una nueva modificación de los valores del DAS28 y el SDAI más estricta, basándose en la opinión y consenso de reumatólogos experimentados (Aletaha, Nell, et al. 2005) (Tabla 5).

Tabla 5. Puntos de corte para las categorías de actividad según el DAS, DAS28 y SDAI.

	Categoría	Definición original	Nueva definición propuesta
DAS	Remisión	<1,6	
	Actividad baja	<2,4	
	Actividad moderada	<2,4 <DAS <3,7	
	Actividad alta	≥ 3,7	
DAS28	Remisión	<2,6	<2,4
	Actividad baja	<3,2	<3,6
	Actividad moderada	3,2< DAS28 <5,1	3,6< DAS28 <5,5
	Actividad alta	≥ 5,1	≥ 5,5
SDAI	Remisión	<5	<3,3
	Actividad baja	<20	<11
	Actividad moderada	20 < SDAI < 40	11<SDAI<26
	Actividad alta	≥40	≥26

1.1.9.4. Evaluación de la discapacidad física

Existen diversas formas de estimar la capacidad funcional basadas en la movilidad articular o en la capacidad para realizar determinadas tareas evaluadas por un observador. Los métodos más extendidos actualmente son los cuestionarios específicos para enfermedades reumáticas como el “Health Assessment Questionnaire” (HAQ), el “Modified Health Assessment Questionnaire” (MHAQ) la versión reducida del HAQ o el “Arthritis Impact Measurements Scales” (AIMS). Estos cuestionarios se basan en la opinión del propio enfermo sobre su enfermedad y son instrumentos estandarizados, de fiabilidad y validez contrastada, que evalúan aquellas dimensiones de la salud que se ven más afectadas por la AR, entre las cuales cabe destacar la discapacidad, sobre todo en relación con la función física, y el dolor.

1.1.10 TRATAMIENTO

La AR es una enfermedad crónica que con el tiempo y sin tratamiento evoluciona a daño articular irreversible, presencia de complicaciones extraarticulares y discapacidad. Los tratamientos no son curativos, pero reducen el dolor y la inflamación, pueden disminuir la progresión del daño articular, conservar la capacidad funcional y resolver o evitar las complicaciones extraarticulares.

Para ello disponemos de tres tipos de tratamientos: 1) los tratamientos no farmacológicos (que incluyen la educación del paciente, el reposo y el ejercicio y la terapia funcional), 2) la terapia farmacológica y 3) la cirugía.

Se han publicado diversos protocolos y recomendaciones para el tratamiento de la AR. En el *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* utilizamos las guías de la Sociedad Española de Reumatología (SER) y la del EULAR.

1.1.10.1. Recomendaciones y Guía de Práctica Clínica de la SER

El consenso de la SER publicado el año 2010 (Tornero Molina et al. 2015), recomienda que todos los pacientes con AR sean tratados con un fármaco modificador de la enfermedad (FME) tan pronto como se establezca el diagnóstico clínico de la enfermedad, independientemente del cumplimiento de los criterios de clasificación del ACR/EULAR. El tratamiento inicial recomendado en todos los pacientes que no hayan sido tratados anteriormente con ningún FME es el metotrexato (MTX), por su excelente perfil de eficacia y seguridad. Para la utilización óptima del MTX como agente inductor de remisión en la AR de inicio se recomienda una escalada rápida de la dosis, hasta alcanzar los 20 o 25 mg semanales, a los 3-4 meses de iniciar el MTX. En caso de refractariedad, se debe asegurar la biodisponibilidad del MTX administrándolo por vía subcutánea. No obstante, dada la complejidad clínica de la AR, el consenso considera que en algunas situaciones clínicas el tratamiento inicial con fármacos modificadores de enfermedad pueda consistir en la utilización de otros fármacos que también han demostrado su capacidad de controlar los síntomas y signos de la enfermedad, así como de retrasar la progresión radiológica.

En la AR de inicio sin marcadores de mal pronóstico (erosiones radiológicas, FR, ACPA, ausencia de enfermedad extraarticular, HAQ superior a 1 o elevada carga inflamatoria), es aceptable el uso inicial de otros FMEs con un perfil de menor toxicidad o con una monitorización de efectos secundarios más sencilla, entre los que los antipalúdicos o la Salazopirina (SSZ) son ejemplos típicos.

En cambio, en la AR de inicio en la que se prevé un curso especialmente incapacitante por las características de la enfermedad, del paciente o de la actividad laboral de éste, puede estar indicada la terapia combinada de inicio con MTX y un agente anti-TNF, con el objetivo de inducir una rápida remisión e intentar retirar el agente anti-TNF y mantener la remisión de la AR con el MTX en monoterapia.

1.1.10.2. Recomendaciones EULAR

El año 2010, EULAR publica las 15 recomendaciones para el manejo de la AR con tratamientos modificadores de la enfermedad tanto sintéticos como biológicos (Josef S Smolen et al. 2010). Estas recomendaciones parten de 3 principios básicos: 1) Los Reumatólogos son los especialistas que deberían manejar los pacientes con AR, 2) El tratamiento de los pacientes con AR debe aspirar a la mejor atención y debe basarse en una decisión conjunta entre el paciente y el reumatólogo, y 3) La AR produce un gran coste sanitario y de productividad, lo cual debe ser considerado por el Reumatólogo durante el manejo de la enfermedad.

Las recomendaciones del consenso EULAR se muestran en la Tabla 6.

1.1.10.3. Tratamientos farmacológicos

- Fármacos moduladores de la enfermedad sintéticos:

La probabilidad de obtener una respuesta favorable al tratamiento con FMEs y una menor progresión radiológica, es mayor cuanto menor sea el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el inicio de un tratamiento (Egsmose C, Lund B, Borg G, Pettersson H, Berg E 1995; van der Heide et al. 1996; Tsakonas et al. 2000; Anderson et al. 2000; Landewé et al. 2002; Möttönen et al. 2002; van Jaarsveld et al. 2000). Dentro del grupo de FMEs existe una gran variedad de fármacos: Metotrexato, Leflunomida, Salazopirina e Hidroxicloroquina.

El Metotrexato (MTX) es considerado el FME sintético de referencia y forma parte de la estrategia terapéutica inicial en los pacientes con AR. El MTX es un antimetabolito que actúa inhibiendo competitivamente la dihidrofolato reductasa. Esta enzima participa en la formación del tetrahidrofolato necesaria para la formación del nucleósido timidina, requerido para la síntesis de ADN, ARN, timidilatos y proteínas.

- 1.- El tratamiento con FMEs sintéticos deben iniciarse tan pronto como se haga el diagnóstico de la AR.
- 2.- El tratamiento debe ser dirigido a alcanzar la remisión o la baja actividad de la enfermedad lo más rápido posible; mientras que el objetivo no sea alcanzado, se requiere de un control estricto y ajustes terapéuticos frecuentes (cada 1-3 meses).
- 3.- El MTX debe ser parte de la primera estrategia terapéutica en pacientes con AR activa.
- 4.- Cuando existen contraindicaciones o intolerancia al MTX, los siguientes FME deberían ser considerados como parte de la primera línea de tratamiento: Leflunomida (LEF), Salazopirina (SSZ) u Oro inyectable.
- 5.- En pacientes no tratados previamente con FME, independientemente del tratamiento con glucocorticoides (GCs), se prefiere iniciar tratamiento a régimen de monoterapia con un FME sintético en lugar iniciar terapia combinada.
- 6.- Los GCs a dosis de bajas a moderadas asociados al tratamiento con FMEs sintéticos proporcionan un beneficio inicial a corto plazo, pero se deben disminuir tan rápidamente como clínicamente sea factible.
- 7.- Si el objetivo del tratamiento no se logra con la primera estrategia de FME, en ausencia de factores de mal pronóstico, se debe considerar el cambio a otro FME sintético. Si existen factores de mal pronóstico, se puede plantear el cambio a un FME biológico.
- 8.- En los pacientes que no responden al tratamiento con MTX y/u otros FMEs sintéticos con o sin GCs asociados, debe iniciarse tratamiento con FMEs biológicos. La práctica actual sería comenzar un anti-TNF (Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab, Infliximab), que se combinará con MTX.
- 9.- Los pacientes con AR que hayan fracasado a un primer anti-TNF, deben recibir otro anti-TNF, Abatacept, Rituximab o Tocilizumab.
- 10.- En los casos de AR grave refractaria o con contraindicaciones al tratamiento con FMEs biológicos o los FMEs sintéticos mencionados anteriormente, también podrían ser considerados los siguientes FMEs sintéticos, tanto en monoterapia como en combinación con algunos de los FMEs mencionados anteriormente: Azatioprina (AZA), Ciclosporina A (CpA) o, excepcionalmente, Ciclofosfamida (CF).
- 11.- El tratamiento intensivo deben considerarse en todos los pacientes, aunque aquellos que presenten factores de mal pronóstico son los que más se beneficiaran.
- 12.- Si un paciente está en remisión persistente, después de haber reducido el tratamiento con GCs, se puede considerar disminuir la dosis del FME biológicos, sobre todo si este tratamiento se combina con un FME sintético.
- 13.- En los casos de remisión sostenida a largo plazo, la disminución cuidadosa de la dosis FME sintético podría ser considerado como una decisión compartida entre el paciente y el médico.
- 14.- En aquellos pacientes con marcadores de mal pronóstico y que no hayan sido tratados previamente con FMEs sintéticos, se podría considerar la terapia combinada de MTX junto con un agente biológico.
- 15.- Aparte de la actividad de la enfermedad, en el ajuste de tratamiento deben tenerse en cuenta factores tales como la progresión del daño estructural, comorbilidades y la seguridad.

Tabla 6. Recomendaciones del consenso EULAR para el tratamiento de pacientes con AR. Texto traducido de: Smolen, et al. Ann Rheum Dis. 2010 Jun 1; 69(6): 964–975.

El mecanismo de acción del MTX es complejo y no se conoce con exactitud, aunque se postulan cuatro posibles mecanismos: 1) inhibición de la síntesis de purinas y pirimidinas 2) disminución de la acumulación de agentes tóxicos como las poliaminas, 3) reducción de la proliferación de células del sistema inmunológico y 4) aumento de los niveles extracelulares de adenosina (purina). Es de este último mecanismo del que más evidencias se dispone (Chan and Cronstein 2002).

El MTX es un fármaco que ha demostrado en diversos ensayos clínicos y estudios observacionales su eficacia clínica. Se han descrito asimismo, múltiples ventajas respecto a otros FMEs con eficacia similar, como su perfil de seguridad, una administración cómoda y una menor tasa de abandono del tratamiento a medio-largo plazo (Choi et al. 2002).

Antiguamente la dosis utilizada de MTX era de 7,5 mg/semana, pero con los años y la experiencia, actualmente las guías recomiendan una escalada rápida de la dosis, hasta alcanzar los 20 ó 25 mg semanales, a los 3-4 meses de iniciar el MTX. En caso de refractariedad al tratamiento, se debe asegurar la biodisponibilidad del MTX administrándolo por vía subcutánea una vez por semana.

La experiencia acumulada del uso de MTX supera considerable la de otros FMEs. Los efectos secundarios más frecuentes son: alteraciones gastrointestinales y estomatitis (McKendry 1997), alopecia, y síntomas del sistema nervioso central como cansancio, cefalea y dificultad de concentración, habitualmente presentados el día de la ingesta, y son el principal motivo de suspensión. Se han propuesto algunas opciones para mejorar la tolerancia al fármaco, como administrar el fármaco por la noche o cambiando la vía de administración de oral a parenteral (O'Dell 1997).

Se ha descrito una asociación del tratamiento con MTX a alteraciones pulmonares como, por ejemplo, neumonitis intersticial aguda, fibrosis pulmonar, nodulosis, bronquiolitis obliterante con neumonía organizada y otras patología pulmonares (Cannon 1997). A pesar de la dificultad de discernir si se trata de un efecto adverso del fármaco o de la evolución de la propia AR, se recomienda la suspensión del MTX y la administración de GC.

- Fármacos moduladores de la enfermedad biológicos:

Las terapias biológicas han supuesto un gran avance en el tratamiento de la AR, dado que permiten un mejor control de los síntomas de enfermedad, un menor deterioro radiológico y proporcionan una mejor calidad de vida a los pacientes afectados de AR.

Generalmente se trata de anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, o proteínas de fusión con una acción sobre una diana específica. En la actualidad, existen 5 grupos diferentes, clasificados según sus dianas terapéuticas. Todos ellos están indicados en el tratamiento de la AR moderada a grave en la que hayan fracasado otros FME no biológicos.

A.- Anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral: Infliximab (anticuerpo quimérico), Etanercept (proteína de fusión que consta de la fracción constante de una inmunoglobulina pegada a un receptor de TNF), Adalimumab (anticuerpo monoclonal humano), Certolizumab pegilado (anti-TNF formado por la fracción variable de un anticuerpo (Fab') monoclonal murino humanizado unido a dos moléculas de polietilenglicol) y, Golimumab (anticuerpo Monoclonal IgG1 humano recombinante).

B.- Rituximab: Anticuerpo monoclonal quimérico que va contra la molécula CD20 que se expresa en la superficie de las células B.

C.- Abatacept: Proteína de fusión formada por el dominio extracelular del CTLA-4 humano y el fragmento constante (Fc) de la IgG1 humana. Se une de forma competitiva y con gran afinidad a CD80/86 y evitan que estas moléculas se unan a CD28, y por tanto previene la activación de los linfocitos T.

D.- Tocilizumab: Anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el receptor de la interleukina 6 (IL-6) tanto en su forma soluble como ligado a la membrana celular.

E.- Anakinra: Forma recombinante no glicosilada del antagonista del receptor de interleukina 1 (IL-1Ra) humano que ejerce su acción de la misma forma que el antagonista endógeno.

1.1.10.4. Otros tratamientos no farmacológicos.

Existen otros tratamientos no farmacológicos como las infiltraciones intraarticulares, la rehabilitación o la cirugía.

A.- Infiltración intraarticular: El tratamiento local recomendado de primera elección es la infiltración intraarticular con esteroides de liberación lenta. Cuando las infiltraciones con esteroides han fracasado (3 infiltraciones consecutivas separadas por 4 semanas), se puede considerar la sinoviólisis isotópica o sinoviólisis química con ácido ósmico. Antes de realizar el

tratamiento local se debe descartar razonablemente la presencia de infección (Chakravarty, Pharoah, and Scott 1994; Jahangier et al. 2005; Bessant et al. 2003) .

B.- Rehabilitación: Se recomienda, desde el momento del diagnóstico, realizar ejercicio físico aeróbico individualizado para cada pacientes y adaptado al grado de preparación física y a las circunstancias articulares y extraarticulares, derivadas de la enfermedad y de las patologías concomitantes. Los ejercicios aeróbicos se pueden combinar con ejercicios de tonificación muscular (regional o general), de flexibilidad y de mejora de la coordinación y destreza manual (Iversen and Petersson 2006; Pedersen and Saltin 2006).

C.- Cirugía: La cirugía suele estar indicada en aquellos casos en que la enfermedad ha provocado destrucción ósea o articular, y una alteración funcional. Previo a la cirugía deben valorarse la calidad del hueso a intervenir, el grado de motivación junto con las preferencias del paciente, la estimación de la modificación de la evolución de la enfermedad por el hecho de aplicar cirugía, y la estimación del grado en que el tratamiento quirúrgico puede reconstruir la función articular y mejorar la independencia del paciente. La prótesis articular es el medio quirúrgico más eficaz para detener la progresiva pérdida funcionalidad, por lo que debería realizarse antes de que se produzcan deformidades irreductibles (Dreyer and Boden 1999; Grob, Schütz, and Plötz 1999).

1.1.11. CRITERIOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Los criterios de respuesta al tratamiento aplicados a pacientes individuales deben tener en consideración el cambio en la actividad de la enfermedad y su grado de actividad actual. El clínico debe evaluar la respuesta al tratamiento clasificándola como satisfactoria (remisión completa de la enfermedad o suficiente aunque no sea completa) o no satisfactoria (ausencia completa o casi completa de mejoría). La respuesta satisfactoria corresponde con una remisión completa de la enfermedad o una respuesta suficiente sin alcanzar la remisión completa, y la respuesta insatisfactoria implica ausencia completa o casi completa de mejoría. El clínico puede llegar a cada una de estas categorías a través de la aplicación de diferentes criterios de respuesta. El más utilizado son los criterios de respuesta de EULAR (Boers et al. 1994).

Los criterios de respuesta de EULAR tienen en cuenta tanto el grado de mejoría como la situación actual del paciente. Utilizan la escala de actividad DAS, que combina diferente información clínica en un único índice con el que puede clasificarse a los pacientes en

diferentes categorías. Aunque existe una cierta confusión por la proliferación de DAS modificados, básicamente existen dos fórmulas validadas (van Gestel et al. 1995) y aplicables a los criterios de mejoría de EULAR: el DAS original (van der Heijde et al. 1992; van der Heijde et al. 1990), que utiliza el índice articular de Ritchie (Ritchie et al. 1968) y un recuento de 44 articulaciones inflamadas, y el DAS28, que utiliza el recuento de 28 articulaciones no graduado. Las definiciones de respuesta satisfactoria o insatisfactoria en función de la aplicación del DAS28 se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Definición de respuesta de EULAR (DAS28)

	Disminución en el DAS28		
DAS28 actual	>1,2	1,2-0,6	<0,6
<3,2	Satisfactoria	Insatisfactoria	
3,2-5,1			
>5,1			

1.2 GENÉTICA Y FARMACOGENÉTICA

1.2.1 PRINCIPIOS GENERALES DE GENÉTICA

1.2.1.1 Estructura del ADN y de los genes

Los cromosomas están compuestos por ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas. El ADN es la molécula que contiene la información genética para el desarrollo y funcionamiento de los seres vivos. La molécula de ADN está constituida por dos cadenas largas de monómeros repetidos, llamados nucleótidos, con polaridad opuesta y unidas entre sí formando una doble hélice (WATSON and CRICK 1953). Cada nucleótido está formado por un azúcar, la desoxirribosa, unida por un enlace covalente a una base nitrogenada y grupos de fosfatos unidos por enlaces éster (Figura 5).

Las bases nitrogenadas pueden ser de 4 tipos diferentes: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C). Se dividen en 2 clases: Las purinas, que están formadas por 2 anillos heterocíclicos unidos (A y G) y las pirimidinas, que están formadas por solo uno de estos anillos (C y T). Los nucleótidos se enlazan entre sí a través del grupo fosfato y forman cadenas (WILKINS, STOKES, and WILSON 1953). Las 2 cadenas de polinucleótidos que constituyen una molécula de ADN, se mantienen unidas entre sí gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas complementarias de ambas cadenas que quedan enfrentadas (2 puentes de hidrogeno entre A y T y tres puentes de hidrogeno entre G y C).

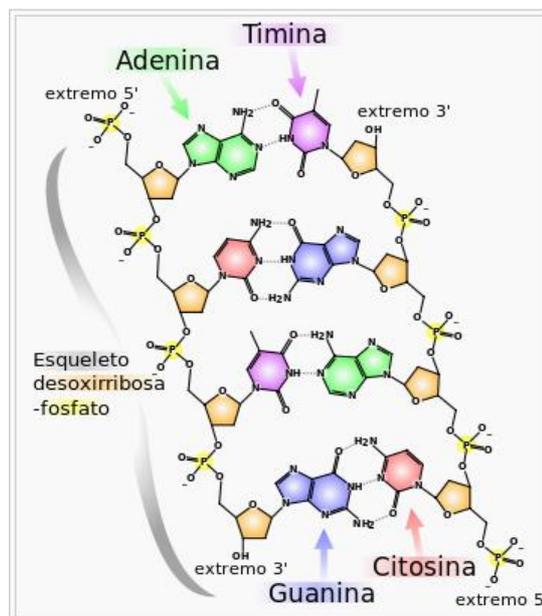


Figura 5. Estructura del ADN. Estructura química del ADN: dos cadenas de nucleótidos conectadas mediante puentes de hidrógeno, que aparecen como líneas punteadas.

La información genética está codificada por la secuencia de nucleótidos del ADN. El inicio de una hebra de ADN se define como 5' y el final como 3'. La dirección de síntesis del nuevo ADN durante su replicación es de 5' a 3'. Los términos 5' y 3' hacen referencia a la posición de las bases nitrogenadas con respecto al azúcar del esqueleto del ADN (Wolfsberg, McEntyre, and Schuler 2001).

La complementariedad de los pares de bases es la clave de la función biológica del ADN. El ADN replica su secuencia de pares de bases siempre que una célula se divida (por mitosis en el caso de la división somática o meiosis en caso de la germinal). Durante este proceso, las 2 cadenas de ADN de cada cromosoma se separan y las enzimas (polimerasas) se unen a cada una de las cadenas, seleccionan nucleótidos complementarios y los emparejan en una secuencia que es complementaria a la de la hebra existente. De esta forma, se obtienen 2 moléculas de ADN de doble cadena (bicatenarias) idénticas.

La información genética contenida en un gen es utilizada para la síntesis de proteínas y para ello son necesarios dos procesos: 1) la transcripción de ADN a ARN mensajero (ARNm) y 2) la traducción del ARNm a proteínas.

Los genes están formados por regiones codificantes, exones, y por regiones no codificantes, intrones. Los intrones son extraídos en el procesamiento del ARN.

Las unidades estructurales de las proteínas son los aminoácidos. Cada aminoácido se define por un grupo de tres bases, conocidas como codones o tripletes. Dado que solo disponemos de 4 bases nitrogenadas, existe un número limitado de posibles combinaciones de éstas que formen codones ($4^3=64$). Diferentes codones pueden codificar para el mismo aminoácido, existiendo 20 aminoácidos diferentes a expensas de los 64 codones del código genético (Figura 6) (Nakamoto 2009). Este fenómeno se conoce como degeneración del código genético. Además, hay codones de inicio, que indican el comienzo de la región codificante de un gen y codones de terminación, que indican el fin de la región codificante.

		Second Letter					
		U	C	A	G		
1st letter	U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU Ser UCC UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC UGA Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU Leu CUC CUA CUG	CCU Pro CCC CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU Arg CGC CGA CGG	U C A G	
	A	AUU Ile AUC AUA AUG Met	ACU Thr ACC ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	U C A G	
	G	GUU Val GUC GUA GUG	GCU Ala GCC GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU Gly GGC GGA GGG	U C A G	

Figura 6. Los aminoácidos y combinaciones de tres nucleótidos posibles. Tabla extraída de: Nakamoto. Gene. 2009 Mar 1;432(1-2):1-6.

1.2.1.2 Variantes genéticas

La variación genética interindividual garantiza a las especies la adaptación a condiciones ambientales diversas, pero los mismos mecanismos que crean esa variación son también responsables de originar mutaciones graves, que pueden desencadenar en algunos individuos incluso enfermedad.

Se denomina *locus* a la localización específica de una región genómica en un cromosoma, aunque un *locus* no necesariamente contiene un gen. Las diferentes formas de una secuencia de ADN en un *locus* particular se denominan variantes genéticas o alelos y el porcentaje de individuos de la población que presenta cada alelo se denomina frecuencia alélica.

Según la frecuencia de las variaciones genéticas nos encontraremos ante mutaciones, con una frecuencia alélica menor del 1% y asociada a patología, o polimorfismos, que son variaciones alélicas de una frecuencia superior al 1%.

- Mutación puntual:

Se define mutación como el cambio persistente de la secuencia del genoma. Una mutación nueva que aparece en una célula individual se denomina mutación *de novo*. Habitualmente, las mutaciones *de novo* no se expresan en la persona que presenta la mutación, pero las siguientes generaciones pueden heredar el cambio en el ADN.

Las mutaciones más habituales son las mutaciones puntuales en el genoma, que cambian, insertan o borran un solo nucleótido del genoma. Otros tipos de mutaciones pueden afectar a fragmentos más grandes del material genético o incluso a la estructura cromosómica, incluida la duplicación genética, inserciones/delecciones, y reordenamientos de las regiones cromosómicas grandes e inversiones cromosómicas.

- Polimorfismo de un solo nucleótido

Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) es una variación en la secuencia de ADN que consiste en una sustitución de una sola base. Los SNP constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas y aparecen una cada 300 bases en promedio a lo largo del genoma humano.

Debido a la degeneración del código genético, un SNP situado en una región codificadora no producirá necesariamente una sustitución del aminoácido. De acuerdo con esto, los SNP producidos en secuencias codificadoras se clasifican en 2 grupos principales: 1) SNP sinónimos, en los que ambas formas traducen el mismo aminoácido sin cambio aparente en la estructura primaria de la proteína, y 2) SNP no sinónimos, en los que cambia la secuencia de la proteína. En este último caso, si la sustitución del aminoácido acontece en el sitio activo de la proteína,

puede representar una pérdida de función (estos SNP se denominan funcionales). Estos tipos de variantes no sinónimas inducen cambios de sentido erróneo en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, también sería posible un cambio sin sentido si la modificación del nucleótido se traduce en un codón de stop mutado que provoque una proteína truncada.

Por otra parte, los SNP en regiones no codificadoras pueden tener consecuencias en el proceso de traducción si afectan a regiones reguladoras (sobre todo en la unión de factores de transcripción) o modificar la secuencia de ARNm (en procesos como el *splicing*).

1.2.1.3 Haplotipos y desequilibrio de ligamiento

Determinadas combinaciones de SNPs están presentes con mayor frecuencia en la población de la que sería de esperar en una organización aleatoria basada en sus frecuencias individuales. Estas asociaciones no aleatorias de SNPs (o secuencias de ADN) en diferentes *loci* de los cromosomas que se transmiten al mismo tiempo, se denominan haplotipos. En otras palabras, un haplotipo es un conjunto de SNPs localizados en el mismo cromosoma que están asociados estadísticamente debido a una recombinación limitada entre ellos. La asociación de 2 SNPs puede cuantificarse por el grado de desequilibrio de ligamiento, que es la diferencia entre las frecuencias relativas observadas y esperadas (asumiendo distribuciones aleatorias), y se representa por un parámetro llamado r^2 (que varía entre 0 y 1). Se considera que 2 SNPs se encuentran en un intervalo de desequilibrio de ligamiento alto si su valor numérico es ≥ 0.8 .

1.2.1.4 Proyecto Hapmap

El *HapMap Project* es una base de datos de los haplotipos descritos en el genoma humano. El fundamento de este proyecto es comparar las secuencias genéticas de los diferentes individuos para identificar regiones cromosómicas donde se comparten las variantes genéticas. Gracias al ordenamiento de haplotipos en el genoma humano y al concepto de desequilibrio de ligamiento, es posible determinar los SNPs representativos de un haplotipo. Denominamos SNPtag o tagger (SNP etiqueta) al SNP que señala la presencia de otros SNPs que se encuentran en desequilibrio de ligamiento alto con éste. De acuerdo con esto, la variación genética de una región genómica puede identificarse al genotipar los SNPtag, sin necesidad de genotipificar todos los SNPs presentes en la región.

La información recopilada del HapMap se publica en la base de datos de SNPs del NCBI, dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). El acceso es gratuito y libre para todo el mundo con el fin de que todas las instituciones investigadoras puedan acceder a él y poder estudiar las

asociaciones existentes entre genes y patologías humanas, susceptibilidad a infecciones o la diferente respuesta a fármacos.

1.2.2 PRINCIPIOS GENERALES DE FARMACOGENÉTICA

La farmacogenética es la ciencia que estudia la variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos, tanto en términos de eficacia como de efectos adversos, según el genotipo de los individuos (Weinshilboum 2003). Por lo tanto, la farmacogenética tiene como objetivo la predicción y prevención del riesgo de fracaso terapéutico y/o toxicidad en pacientes tratados. Aunque generalmente es un término utilizado para referirse al estudio de los genes relacionados con el metabolismo de los fármacos, en la actualidad se extiende también a todos los factores involucrados en su farmacocinética y farmacodinámica (receptores, transportadores, enzimas, canales iónicos,...).

El objetivo principal de la farmacogenética es optimizar el tratamiento de los pacientes mediante una estratificación de éstos en base a la respuesta y/o toxicidad a un determinado fármaco, con el fin de dirigirnos a una terapia personalizada más segura y eficiente.

La farmacogenética contribuye a la medicina personalizada ya que permite al clínico: 1) seleccionar la medicación más adecuada para un determinado paciente y 2) seleccionar la dosis más adecuada de un fármaco para un determinado paciente.

1.2.3 ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS DEL METOTREXATO

El metotrexato (MTX) es el fármaco de elección en primera línea de tratamiento para pacientes con AR. Su amplio uso se debe a su eficacia, su relativo buen perfil de seguridad y su bajo coste. A pesar de su excelente perfil beneficio/riesgo, la eficacia del MTX es variable, con más de un tercio de los pacientes refractarios a esta terapia inmunomoduladora (Weinblatt et al. 2003; Bathon et al. 2000). Por otro lado, en un 10-30% de los casos se debe suspender el tratamiento debido a la aparición de efectos adversos y/o toxicidad hepática (transaminitis, cirrosis), citopenias, úlceras orales o neumonitis intersticial entre otras (Finckh et al. 2006). En estos casos, se deben plantear otras alternativas de tratamiento y, en caso de necesidad, estos pacientes pueden ser tributarios de recibir tratamiento con terapias biológicas que conllevan un coste mucho más elevado.

En las últimas décadas ha habido un gran interés para identificar marcadores biológicos que puedan predecir con exactitud y fiabilidad la eficacia y toxicidad del MTX en pacientes afectos de AR. De manera global, se ha sugerido que polimorfismos en los genes que codifican enzimas diana del MTX y proteínas transportadoras en la vía metabólica del folato pueden ser predictores de respuesta y toxicidad al MTX (Ranganathan et al. 2008). Los resultados de estudios farmacogenéticos basados en el análisis de un gen o genes candidatos no permiten a día de hoy conocer con exactitud cuales pueden utilizarse de forma fiable como predictores de respuesta o toxicidad al MTX en la AR.

El mecanismo de acción del MTX es complejo y no se conoce con exactitud, aunque se postulan cuatro posibles mecanismos: 1) inhibición de la síntesis de purinas y pirimidinas 2) disminución de la acumulación de agentes tóxicos como las poliaminas, 3) reducción de la proliferación de células del sistema inmunológico y 4) aumento de los niveles extracelulares de adenosina (purina). Es de este último mecanismo del que más evidencias se dispone (Bruce N Cronstein 2005; Chan and Cronstein 2002).

El MTX entra en la célula mediante el transportador de folatos reducidos (RFC1, también llamado SLC19A1) y forma poliglutamatos que se acumulan dentro de la célula. El MTX poliglutamado (MTXPG) inhibe la síntesis de purinas y pirimidinas al inhibir diferentes enzimas metabólicas de estas vías: la dihidrofolato reductasa (DHFR), la timidilato sintetasa (TS) y la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa/ IMP (ATIC) (Galivan 1980) (Figura 7).

Al inhibir DHFR e indirectamente la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), disminuye la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato (THF). THF es un precursor del cofactor 5 metil-THF, que contribuye en la metilación de la homocisteína para su conversión a metionina. La metionina es un intermediario necesario para la síntesis de poliaminas fundamentales para el crecimiento y la replicación celular (van Ede et al. 1998; Kremer 2004). La MTHFR no se inhibe directamente por MTX, pero está influenciada por éste a través de sus efectos en la cadena de folato intracelular.

Los MTXPG también inhiben la TS, una enzima esencial en la biosíntesis de pirimidinas, que convierte desoxiuridilato en desoxitimidilato (Szeto et al. 1979). Asimismo, los MTXPG causan acumulación intracelular de AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) y una disminución de FAICAR (10-formil AICAR) al inhibir ATIC. El acúmulo de AICAR aumenta la inhibición de la adenosindesaminasa (ADA), lo que conlleva a un aumento de adenosina

extracelular, uno de los mecanismos de acción del MTX. Por otro lado, la disminución de FAICAR, afecta secundariamente en la vía del ATP, y producen una disminución en la síntesis de purinas de *ново* (Kremer 2004).

La retención de MTX dentro de la célula, se ve facilitada por la poliglutamación producida por la encima folipoliglutamato sintetasa (FPGS). Este proceso puede ser revertido por la enzima gamma glutamil hidrolasa (GGH) y facilita el flujo de salida de MTX. La salida de MTX de la célula se produce a través de la familia de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC).

En la presente tesis el estudio farmacogenético del MTX en la AR lo hemos dividido en:

- 1) genes de la vía metabólica del ácido fólico que son diana del MTX.
- 2) genes implicados en el transporte intra y extracelular del MTX y en la poliglutamación de éste.

1.2.3.1 Genes de la vía metabólica del ácido fólico que son diana del MTX

Los genes más estudiados que forman parte de la vía metabólica del ácido fólico son *MTHFR*, *DHFR*, *TS* y *ATIC*. FIGURA 7

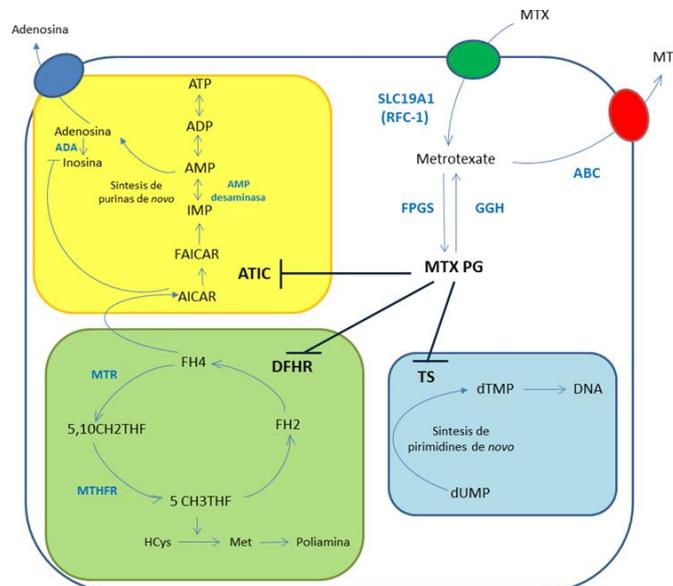


Figura 7. Vía metabólica y de transporte del Metotrexato. SLC19A1(RFC-1): transportador reducido del folato 1; FPGS: foli polígama glutamato sintetasa; GGH: Gamma glutamil hidrolasa; ABC: "ATP-bindingcassette"; AICAR: 5-aminoimidazol 4-carboxamida ribonucleotido; FAICAR: 10-formil AICAR; ATIC: AICARformiltransferasa; ADA: Adenosindesaminasa; TS: Timidilatosintetasa; dUMP : Desoxiuridilato; dTMP : Desoxitimidilato; DHFR: Dihidrofolatoreductasa; FH2: Dihidrofolato; FH4: Tetrahidrofolato; 5,10 CH2-THF: 5,10-methilendetrahidrofolato; 5 CH3-THF: 5-methiltetrahidrofolato; MTR: 5-metiltetrahidrofolato-homocisteina metiltransferasa; MTHFR: Metilentetrahidrofolatoreductasa; HCys: Homocisteina; Met: Metionina.

- Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR)

La MTHFR cataliza la reducción del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, un cofactor indispensable como donador de grupos metilos requeridos para llevar a cabo la remetilación de homocisteína a metionina. Su inhibición conduce a una disminución de poliaminas, moléculas necesarias para el crecimiento y replicación celular.

El gen MTHFR se encuentra localizado en el cromosoma 1p y contiene 11 exones (Goyette et al. 1998). Se han descrito varios polimorfismos en el gen *MTHFR*, aunque los más estudiados son rs1801133 (677C>T) y rs1801131 (A1298C).

MTHFR rs1801133 (677C>T) es un polimorfismo no sinónimo que origina la sustitución de alanina por valina en el codón 222 de la enzima MTHFR. Este cambio de aminoácido produce una forma termolábil de MTHFR que disminuye su actividad y produce una elevación secundaria de los niveles de homocisteína en plasma.

MTHFR rs1801131 (1298A>C) es también un polimorfismo no sinónimo que origina la sustitución de glutamina por alanina en el dominio C-terminal de la enzima MTHFR, lo que produce la disminución de la actividad de ésta.

- Dihidrofolato Reductasa (DHFR)

El gen de la DHFR está localizado en la región q11.2-q13.2 del cromosoma 5. La dihidrofolato reductasa convierte dihidrofolato en tetrahidrofolato, un grupo metilo requerido para la síntesis *de novo* de purinas, timidina monofosfato y ciertos aminoácidos. Debido a que el tetrahidrofolato, el producto de esta reacción, es la forma activa de folato en los seres humanos, la inhibición de DHFR puede causar deficiencia de folato funcional. DHFR es una diana terapéutica atractiva debido a su papel fundamental en la síntesis de ADN precursor. El MTX inhibe DHFR y reduce indirectamente la producción de THF.

- Timidilato Sintetasa (TS)

El gen *TS* está situado en el cromosoma 8 (chr18 : p11.32 - p11.32). La TS es una enzima clave en la síntesis *de novo* del timidilato y se inhibe directamente por MTXPG. En la región promotora del gen de la *TS* se han descrito distintos polimorfismos que tienen relación con la transcripción del gen (Figura 8).

En la región promotora de la *TS* hay una secuencia variable de repeticiones en tandem (VNTR) de 28 pares de bases. Los alelos con dos (TS^*2) y tres (TS^*3) repeticiones en tandem son los más frecuentes. Existe una asociación entre el polimorfismo VNTR y los niveles de expresión proteica, probablemente a consecuencia de la eficiencia en la traducción del gen, y/o de la actividad enzimática. El VNTR también afecta al nivel de actividad; el ARN mensajero con tres

repeticiones tiene una mejor eficiencia en la traducción que los que tienen dos repeticiones. Los individuos homocigotos para la triple (3R) repetición del alelo de *TS* presentan una mayor expresión de ARNm y una mayor actividad enzimática de *TS* en comparación con aquellos con el alelo 2R (Ranganathan 2008). Asimismo, en la segunda repetición del alelo *TS**3 existe un SNP que consiste en una sustitución G>C en el nucleótido 12.

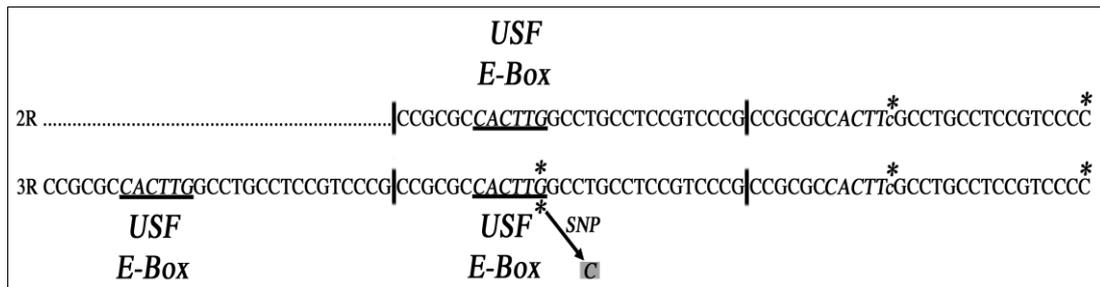


Figura 8. Secuencia variable de repeticiones en tandem (VNTR) de 28 pares de bases situado en la región promotora de la *TS*. Imagen extraída del artículo: Páez D, et al. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Nov;136(11):1681-9.

- Ciclina D1 (CCND1)

El gen de la ciclina D1 (CCND1) se localiza en el cromosoma 11 (q13.3 - q13.3).

En el ciclo celular la ciclina D1 interviene en la fosforilación de la proteína retinoblastoma, que provoca la liberación de los factores de transcripción E2F-1 y DP-1. Estos factores de transcripción regulan genes implicados en la replicación del ADN, entre los cuales cabe destacar la *TS* y la *DHFR*. La CCND1 modula de una forma indirecta los niveles de *TS*, y modifica consecuentemente los niveles de MTXPG intracelulares.

El polimorfismo A870G del gen *CCND1* modula el *splicing* del mRNA y altera la expresión de la ciclina D1 [Betticher *et al*, 1995].

- 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótidoformil transferasa (ATIC)

El gen *ATIC* está localizado en el cromosoma 2 (chr2 : q35 - q35). La proteína ATIC está implicada en la liberación extracelular de adenosina, al desempeñar un papel fundamental en los efectos anti-inflamatorios de MTX (B N Cronstein, Naime, and Ostad 1993).

El polimorfismo más estudiado de *ATIC*, rs2372536 (347C>G), provoca un cambio de aminoácido de Treonina a Serina. El polimorfismo puede causar una disminución en la actividad enzimática de ATIC y afectar a la acumulación de AICAR, hecho que produce un aumento de la liberación extracelular de adenosina.

1.2.3.2 Genes implicados en el transporte intra y extracelular del MTX y en su poliglutamación

- Transportador de folato reducido de proteína 1 (RFC1)

El RFC1, también conocido como SLC19A1, media el transporte del MTX dentro de la célula. Debido a esta implicación en el transporte intracelular del fármaco (Dixon et al. 1994; Prasad et al. 1995; Matherly, Hou, and Deng 2007), se han estudiado diferentes polimorfismos de su gen, localizado en el cromosoma 21 (21q22.3), con el fin de encontrar asociación con la eficacia y/o toxicidad del MTX en pacientes con AR .

- ATP-binding cassette B1 (ABCB1)

Los transportadores ATP-binding cassette (ABCs) están implicados en el flujo de salida del MTX celular. En concreto el gen *ABCB1*, situado en el cromosoma 7 (chr7 : q21.12 - q21.12) y codifica para la glicoproteína-P, que participa en el eflujo de xenobióticos. Varios estudios realizados en pacientes con AR describen que polimorfismos de los transportadores ABC podrían tener un impacto significativo sobre las propiedades farmacocinéticas de MTX. El más estudiado es el SNP funcional C3435T en el exón 26 del gen [Hoffmeyer *et al*, 2000].

- Folipoliglutamato sintetasa (FPGS)

El gen de *FPGS* está localizado en el cromosoma 9 (q34.11 - q34.11). La cantidad de MTX poliglutamado intracelular depende, en gran medida, de la actividad de la FPGS, que es la enzima encargada de unir moléculas de glutamato al MTX. Se ha demostrado que el MTXPG es al menos tan eficaz como el MTX en su papel de inhibición de DHFR (Galivan 1980), pero presenta una mayor retención celular que proporciona un mayor potencial citotóxico que el MTX sin poliglutarar. Sin embargo, pueden aumentar la toxicidad de MTX por tener una vida media más larga dentro de la célula.

- Gamma glutamil hidrolasa (GGH)

El gen *GGH* se sitúa en el cromosoma 8 (chr8 : q12.3 - q12.3). La enzima GGH tiene la función de revertir la poliglutamación del MTX. Permite de este modo que el MTX pueda ser eliminado de la célula (Schneider and Ryan 2006).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La Farmacogenética estudia las variantes genéticas que influyen en la respuesta a los fármacos, con el objetivo que los pacientes puedan someterse a tratamientos más eficaces y menos tóxicos. Los estudios farmacogenéticos están adquiriendo una especial relevancia en el campo de la reumatología clínica, dado que los tratamientos inmunosupresores no siempre son efectivos y pueden asociarse a la aparición de efectos adversos.

La hipótesis de este trabajo es la existencia de marcadores genéticos que puedan predecir la toxicidad y/o la respuesta al metotrexato en pacientes con artritis reumatoide.

Los objetivos del trabajo son:

Valorar la utilidad de diferentes marcadores farmacogenéticos en relación a la respuesta y/o toxicidad de pacientes con artritis reumatoide tratados con metotrexato en monoterapia:

1) Analizar la asociación entre las variantes farmacogenéticas de los genes *DHFR*, *TS*, *MTHFR*, *ATIC* y *CCND1* involucrados en el mecanismo de acción del MTX y la respuesta y/o toxicidad del MTX en pacientes con artritis reumatoide.

2) Evaluar la asociación entre las variantes farmacogenéticas de los genes *SLC19A1/RFC1*, *ABCB1*, *FPGS* y *GGH* involucrados en la farmacocinética del MTX y la respuesta y/o toxicidad del MTX en pacientes con artritis reumatoide.

RESULTADOS

3.1 POLYMORPHISMS IN GENES INVOLVED IN THE MECHANISM OF ACTION OF METHOTREXATE: ARE THEY ASSOCIATED WITH OUTCOME IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS?

Salazar J, Moya P, Altés A, Díaz-Torné C, Casademont J, Cerdà-Gabaroí D, Corominas H, Baiget M. Pharmacogenomics. 2014 Jun;15(8):1079-90. doi: 10.2217/pgs.14.67. PMID:25084201

RESUMEN

- Antecedentes: El metotrexato (MTX) es la primera línea de tratamiento para los pacientes con artritis reumatoide (AR) de diagnóstico reciente. Sin embargo, solo responden al tratamiento entre el 50 y 70% de los pacientes y hasta un 30% sufren toxicidad.

- Objetivo: Identificar marcadores farmacogenéticos de respuesta y/o toxicidad en pacientes con AR tratados con MTX.

- Métodos: Se analizaron 27 variantes genéticas en los genes DHFR, TYMS, MTHFR, ATIC y CCND1.

- Resultados: Se incluyeron 124 pacientes con AR tratados con MTX en monoterapia. En el análisis multivariado dos variantes en el gen MTHFR, rs17421511 (P = 0,024) y rs1476413 (P = 0,0086), y una en el gen DHFR, rs1643650 (P = 0,026), se asociaron con la respuesta al fármaco. La variante rs16853826 ATIC se asoció con toxicidad (P = 0,039).

- Conclusión: variantes genéticas en MTHFR, DHFR y ATIC pueden considerarse como marcadores farmacogenéticos de eficacia y/o toxicidad en los pacientes con AR tratados con MTX en monoterapia.

Palabras claves: Metotrexato, Artritis reumatoide, 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR), dihidrofolato reductasa (DHFR), 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotido transformilasa (ATIC)



Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients?

Background: Methotrexate (MTX) is the first-line treatment option for newly diagnosed rheumatoid arthritis (RA) patients. However, 50–70% of the patients respond to treatment and 30% suffer toxicity. **Aim:** To identify pharmacogenetic markers of outcome in RA patients treated with MTX. **Patients & methods:** We analyzed 27 genetic variants in *DHFR*, *TYMS*, *MTHFR*, *ATIC* and *CCND1* genes. **Results:** We included 124 RA patients treated with MTX monotherapy. In multivariate analyses two variants in the *MTHFR* gene were associated with response, rs17421511 ($p = 0.024$) and rs1476413 ($p = 0.0086$), as well as one in the *DHFR* gene, rs1643650 ($p = 0.026$). The *ATIC* rs16853826 variant was associated with toxicity ($p = 0.039$). **Conclusion:** *MTHFR*, *DHFR* and *ATIC* genetic variants can be considered as pharmacogenetic markers of outcome in RA patients under MTX monotherapy.

Original submitted 10 January 2014; Revision submitted 28 March 2014

Keywords: 5-aminopyrimidin-2,4-dihydroxymethyl tetrahydrofolate transferase • 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase • *ATIC* • *DHFR* • dihydrofolate reductase • methotrexate • *MTHFR* • rheumatoid arthritis

Background

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systemic, inflammatory autoimmune disease of unknown etiology. Although it mainly affects the diarthrodial joints, extra-articular manifestations may appear. RA pathogenesis is due to a complex interaction between environment and genes, leading to a breakdown of the immune tolerance and synovial inflammation [1].

Synovial tissues are the target of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), which act by modifying the course of the disease in order to achieve clinical remission or low disease activity. Methotrexate (MTX) relieves symptoms of joint pain and swelling and also protects against long-term sequelae, such as joint destruction, deformity and disability. It is used worldwide as the first-line treatment option for newly diagnosed RA patients owing to its efficacy and safety [2–5]. However, only 50–70% of patients respond

to treatment and up to one-third discontinue treatment because of adverse drug events (ADEs) [6–10]. New biologic therapies are highly effective in RA, but they are expensive and have significant toxicity profiles. It is therefore of great interest to identify biomarkers that help to predict MTX efficacy and toxicity before starting therapy.

The mechanism of action through which MTX causes anti-inflammatory effects is complex (Figure 1) [11]. Once inside the cells, a portion of MTX is polyglutamylated and this reaction generates active forms of the drug, the MTX polyglutamates (MTXPGs) [12]. MTX and MTXPGs inhibit several enzymes involved in the folate pathway. The *DHFR* enzyme reduces dihydrofolate into tetrahydrofolate (THF) and its inhibition alters purine and thymidylate biosynthesis. *TYMS* catalyzes the methylation of deoxyuridine-5-monophosphate to deoxythymidine-5-monophosphate, a precursor of

Juliana Salazar^{1,2}, Patricia Moya^{1,3,4}, Albert Altés⁵, César Díaz-Torné³, Jordi Casademont³, Dacia Cerdà-Gabarió⁶, Hèctor Corominas⁶ & Montserrat Baiget^{1,2}

¹Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025, Barcelona, Spain

²U705, CIBERER, Barcelona, Spain

³Internal Medicine Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Sant Pau, Barcelona, Spain

⁴Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

⁵Hematology Department, Fundació Althaia, Manresa, Barcelona, Spain

⁶Rheumatology Department, Hospital Moisès Broggi, Sant Joan Despi, Barcelona, Spain

*Author for correspondence:

Tel.: +34 93 5537376

Fax: +34 93 5537373

mbaiget@santpau.cat

¹Authors contributed equally

de novo pyrimidine synthesis. Gene expression of the DHFR and TYMS enzymes is regulated by the transcription factors E2F-1 and DP-1. The availability of these transcription factors is controlled by CCND1, a protein involved in Rb protein phosphorylation [13]. The enzyme MTHFR, which catalyzes the reduction reaction of 5,10-methylene-THF to 5-methyl-THF, is not directly inhibited by MTX although its functionality is influenced by the depletion of the intracellular folate pool due to DHFR inhibition. MTXPGs also target TYMS and ATIC. The ATIC enzyme catalyzes the last two steps of *de novo* purine synthesis. Its inhibition produces an intracellular accumulation of AICAR, increasing the release of adenosine into the circulation. Extracellular adenosine increases cAMP, which inhibits production of proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IFN- γ and IL-1 β . These cytokines play a key role in the inflammatory process in RA and their inhibition accounts for the therapeutic effect of MTX [14].

The variable clinical response and the unpredictable toxicity in RA patients receiving MTX prompted us to study the role of genetic variants in the *DHFR*, *TYMS*,

MTHFR, *ATIC* and *CCND1* genes as biomarkers of response and toxicity.

Patients & methods

Clinical studies

The patients included in this study were recruited consecutively from January 1999 to April 2012 at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) and Hospital Moises Broggi (Barcelona, Spain). All met the European League Against Rheumatism (EULAR)/ American College of Rheumatology (ACR) criteria for diagnosis of RA. This study was approved by the institutional ethics committees and all patients signed informed consent for sample collection and analysis.

The patients received MTX monotherapy for at least 6 months. MTX was administered at standard doses (7.5–25 mg/week), either orally or subcutaneously, and was coadministered with folic or folinic acid supplementation. Other DMARDs (aurotherapy, azathioprine, sulfasalazine, leflunomide and chloroquine) were previously administered in half of the patients. The exclusion criteria were: the use of >10 mg/day of prednisone or equivalent, and simultaneous treatment

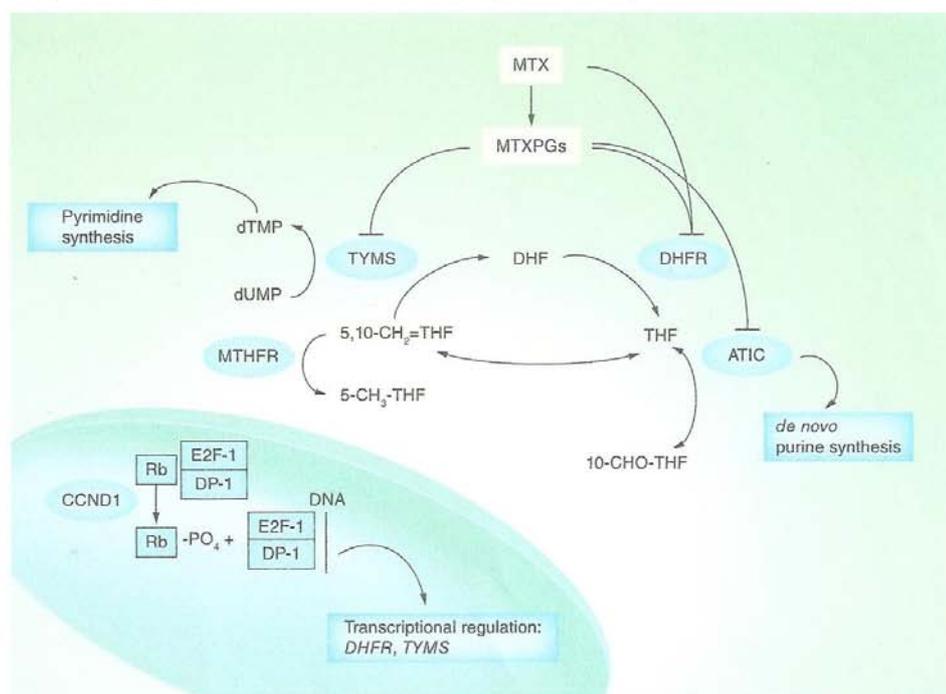


Figure 1. Scheme of the methotrexate pathway. 5-CH3-THF: Methyltetrahydrofolate; 5,10-CH2=THF: Methylene tetrahydrofolate; 10-CHO-THF: 10-formyltetrahydrofolate; DHF: Dihydrofolate; MTX: Methotrexate; MTXPGs: MTX polyglutamates. Adapted with permission from PharmaGKB [11].

with other DMARDs. Patients' clinical data (gender, age at disease onset, duration of MTX treatment, time interval from disease onset to MTX treatment, rheumatoid factor status, anti-CCP status, concomitant use of corticoids and folic acid) were collected from clinical records.

Disease activity was measured using the Disease Activity Score (DAS28) [15], the Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI) [16]. Clinical response to MTX therapy was evaluated using the EULAR criteria that takes into account the differences between DAS28 scores at baseline and at 6 months [17]. Response was defined as: good, when the DAS28 score at end point was ≤ 3.2 and improvement from baseline was ≥ 1.2 ; moderate, when DAS28 at end point was between 3.2 and 5.1, together with an improvement between 0.6 and 1.2; or poor, when DAS28 at end point was higher than 5.1 and the improvement was ≤ 0.6 over the baseline DAS28. For data analysis, we classified the patients as good or moderate as responders and the patients classified as poor as nonresponders.

ADEs were defined following the criteria detailed in Table 1. Toxicity was measured as the time from the start of MTX monotherapy to drug discontinuation due to the appearance of any of the ADEs reported in Table 1.

Clinical parameters in all patients were evaluated by the same rheumatologist (C Díaz-Torné from the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and H Corominas

from the Hospital Moises Broggi), guaranteeing homogeneity of clinical criteria. Both investigators were blinded to genetic results.

Genetic studies

We selected 27 polymorphisms located in five genes (*DHFR*, *TYMS*, *MTHFR*, *ATIC* and *CCND1*) involved in the mechanism of action of MTX. The SNPs within these genes were selected using HapMap genome browser and Haploview software v.4.2 and public literature resources (NCBI PubMed). Selection criteria were: an r^2 threshold of 0.8; a minor allele frequency $>10\%$ in Caucasians; and published clinical associations. Table 2 shows the characteristics of the SNPs analyzed.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by the salting-out procedure (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany) and DNA was quantified using the BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Duisburg, Germany). SNPs were genotyped by means of real-time PCR using a 48.48 dynamic array on the BioMark™ system (Fluidigm, CA, USA). The samples and the TaqMan® SNP genotyping assay (Applied Biosystems, CA, USA) mixes were prepared following the manufacturer's instructions. The end point fluorescent image data were analyzed using Fluidigm SNP Genotyping Analysis Software. The rs70991108 polymorphism, a 19 bp insertion/deletion in the *DHFR* gene, was determined by a conventional PCR method [18]. The common variants in the *TYMS* gene,

Table 1. Adverse drug events and their definitions.

Adverse drug event	Definition
Hepatotoxicity	ALT values $<$ three-times the upper limit of normal levels in absence of previous enzyme elevation, concomitant hepatotoxic drugs, positive viral hepatitis markers and alcohol consumption
Liver disease	ALT values \geq three-times the upper limit of normal levels
Gastrointestinal complaints	Nausea, anorexia, vomiting and abdominal pain
Mucosal ulcerations	Loss of the mucosal layer within the mouth
Nodulosis	A local subcutaneous swelling or tissue lump in association with rheumatoid arthritis
Pneumological infections	Severe or mild depending on the patients' necessity of intravenous treatment
Other infections	Including lower urinary tract infection
Alopecia	Loss of hair from the head
Lung disease	Dyspnea (with or without dry cough, fever and malaise) associated with a new interstitial pneumonitis at x-ray in absence of any demonstrable infectious etiology
Leukopenia	Mild leukopenia: $4.0-2.0 \times 10^9/l$, moderate: $2.0-0.5 \times 10^9/l$ and severe $<0.5 \times 10^9/l$
Cancer of solid organ	Solid tumors that grow as a mass of cells in a particular organ, tissue or gland

Table 2. Characteristics of the polymorphisms analyzed.

Gene (location)	refSNP	Change	Region	MAF
DHFR (5q11.2-q13.2)	rs408626	A>G	5'-UTR	0.46
	rs1650697	G>A	Exon 1 (5'-UTR)	0.23
	rs70991108	19pb ins/del	Intron 1	0.46
	rs1643650	T>C	Intron 3	0.27
TYMS (18p11.32)	rs45445694	VNTR 28 bp	5'-UTR	-
	rs183205964	C>G nt12 VNTR	5'-UTR	-
	rs2847153	G>A	Intron 2	0.17
	rs2847150	G>A	Intron 3	0.27
	rs2847149	G>A	Intron 3	0.42
	rs16948305	C>T	Intron 3	0.12
MTHFR (1p36.3)	rs13306561	A>G	Intron 1	0.14
	rs9651118	T>C	Intron 2	0.20
	rs11121832	C>T	Intron 4	0.25
	rs4846052	C>T	Intron 4	0.41
	rs17421511	G>A	Intron 4	0.19
	rs1801133	C>T	Exon 5 (p.Ala222Val)	0.37
	rs1801131	A>C	Exon 8 (p.Glu429Ala)	0.29
	rs1476413	C>T	Intron 10	0.27
	ATIC (2q35)	rs10197559	C>T	Intron 4
rs16853782		A>G	Intron 4	0.21
rs2372536		C>G	Exon 5 (p.Thr116Ser)	0.26
rs12995526		T>C	Intron 8	0.46
rs7586969		A>G	Intron 12	0.44
rs2177735		A>G	Intron 12	0.33
rs16853826		G>A	Intron 12	0.13
CCND1 (11q13)	rs9344	G>A	Exon 4 (p.Pro241Pro)	0.47
	rs649392	A>G	Intron 4	0.42

MAF: minor allele frequency; VNTR: variable number tandem repeat.

rs45445694 and rs183205964, were determined following previously described PCR conditions [19] and directly sequencing in an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). TYMS genotypes of the patients were classified into high expression type (*2/*3G, *3C/*3G and *3G/3G) or low expression type (*2/*2, *2/*3C and *3C/*3C) [20].

In silico analyses

We used the Regulome database [21] to explore evidence for putative regulatory functions of the variants. The Regulome database contains data from Encyclopedia of DNA elements (ENCODE), expression quantitative trait loci and published literature [22]. We used the software Alamut version 2.3 (Interactive Bioinformatics, Rouen, France) to explore evidence for acceptor and

donor splice sites. This software integrates four different prediction algorithms: SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, Splice Site Prediction by Neural Network and Human Splicing Finder.

Statistical analysis

A χ^2 test was used to study univariate relationships between clinical and genetic variables and response of MTX at 6 months. No adjustments were performed for multiple testing. An association analysis was performed for each SNP using logistic regression models adjusted for covariates (gender, age at disease onset and number of previous DMARDs used) and assuming different genetic models (dominant, recessive, codominant and additive). Toxicity was measured as the time from the start of MTX monotherapy to the

drug discontinuation due to the appearance of any of the ADEs reported in Table 3. Survival curves were estimated using the Kaplan–Meier method. Univariate differences in the survival curves were evaluated using the log-rank test. Results were considered statistically significant when bilateral *p*-values were less than 0.05.

Results

Clinical results

A total of 124 RA patients, 101 (81.5%) women and 23 (18.5%) men, treated with MTX in monotherapy, were enrolled in this study. They had taken 0–3 DMARDs prior to treatment with MTX. Ninety-five patients (76.6%) were rheumatoid factor positive and 90 patients (72.2%) were positive for anti-CCP antibodies (Table 3). We evaluated toxicity in 124 patients but response in only 61 because the EULAR response criteria requires many clinical parameters. Unfortunately, these clinical parameters are not always collected in the clinical records.

We evaluated the response of MTX at 6 months. According to the EULAR response criteria, 45 patients (73.8%) were responders and 16 patients (26.2%) were nonresponders. The mean weekly dose of MTX in these patients was 9.13 mg (5–20 mg). All the patients received folic or folinic acid supplementation. At the onset of treatment, the mean DAS28 was 5.13 (2.17–8.2), the mean SDAI was 24.12 (2.6–71.8) and the mean CDAI was 21.65 (5–63.7). At 6-month follow-up, the average weekly dose of MTX was 12.0 mg (5–25 mg). Mean DAS28 was 3.48 (1.13–6.4), mean SDAI was 10.91 (0.7–42.2) and mean CDAI was 9.92 (0.0–37.2). Clinical activity indexes (DAS28, SDAI and CDAI) at 6 months of MTX showed a clear improvement in disease activity regardless of the index used.

Fifty-nine (47.6%) of the 124 patients had adverse effects related to MTX, the most frequent being gastrointestinal complaints (19%) and hepatotoxicity (14.3%; Table 3). Response was evaluated in 31 of these 59 patients.

Genetic determinants & response

Table 4 summarizes the univariate and multivariate analyses of genetic polymorphisms and MTX efficacy assessed using the EULAR response criteria. In the univariate analyses, three SNPs in *MTHFR* gene were associated with response: rs11121832 C>T, rs17421511 G>A and rs1476413 C>T. For rs11121832, 85.3% of the homozygous C/C, 61.9% of the heterozygous C/T and 50% of the homozygous T/T patients were responders (*p* = 0.02 in an additive model). For rs17421511, 82.9% of the homozygous G/G, 56.2% of the heterozygous G/A and 50% of the homozygous A/A patients

were responders (*p* = 0.029 in an additive model). For rs1476413, 82.9% of patients with the C/C genotype, 68.4% with the C/T genotype and 42.9% with the T/T genotype were also responders (*p* = 0.028 in an additive model). In the multivariate analyses, after adjusting for all the relevant clinical variables, two of the three *MTHFR* gene SNPs, rs17421511 and rs1476413, retained their statistical association regardless of the model of inheritance used in the analyses. The odds ratio (OR) was 3.35 (95% CI: 1.10–10.24; *p* = 0.024 in an additive model) for rs17421511, and 3.56 (95% CI: 1.28–9.91; *p* = 0.0086 in an additive model) for rs1476413. Although rs17421511 and rs1476413 were in a high linkage disequilibrium (*D'* = 0.939), they were not good predictors of each other because the *r*² value was low (*r*² = 0.584). For this reason, we used both SNPs for the association studies. The multivariate analyses of the SNPs in the *DHFR* gene showed that rs1643650 was significantly associated with response: patients with a T/C or C/C genotype showed a better response to MTX monotherapy than patients with

Table 3. Characteristics of the patients enrolled in the study.

Characteristics	Values
Number	124
Women, n (%)	101 (81.5)
Age at onset the treatment, mean (SD), years	55.62 (1.297)
Duration of MTX treatment, mean (SD), months	66.6 (10.81)
Number of previous DMARD, n (%)	
– 0	60 (48.4)
– 1	34 (27.4)
– 2	25 (20.2)
– 3	5 (4.0)
RF positive, n (%)	95 (76.6)
Anti-CCP positive, n (%)	90 (72.6)
Adverse effects, n (%)	
– Hepatotoxicity	18 (14.3)
– Liver disease	3 (2.4)
– Gastrointestinal complaints	24 (19)
– Mucosal ulcerations	1 (0.8)
– Nodulosis	2 (1.6)
– Infections	5 (4.0)
– Alopecia	10 (7.9)
– Lung disease	4 (3.2)
– Mild leukopenia	1 (0.8)
– Leukopenia (moderate–serious)	4 (3.2)
– Cancer of solid organ	2 (1.6)

DMARD: Disease-modifying antirheumatic drug; MTX: Methotrexate; RF: Rheumatoid factor; SD: Standard deviation.

a T/T genotype (OR: 0.31; 95% CI: 0.10–0.96; $p = 0.026$). None of the SNPs remained significantly associated with response in the multiple comparison correction (false-discovery rate).

Because *MTHFR* and *DHFR* variants were consistently associated with response, we constructed a 'responder genotype'. We considered that patients who were G/G for rs17421511, C/C for rs1476413 and T/C or C/C rs1643650 had the responder genotype. Eighteen out of 61 patients evaluated for response had the responder genotype while the remaining 43 patients had other genotype combinations. Seventeen (94.4%) patients with the responder genotype responded to treatment, while only 28 (65.1%) patients with the other genotype combinations responded ($p = 0.019$ in an additive model). The responder genotype retained its statistical association in the multivariate logistic regression analysis (OR: 12.8; 95% CI: 1.4–125; $p = 0.025$). These results show that *MTHFR* and *DHFR* genetic variants have an additive effect on response.

Genetic determinants & toxicity

Table 1 includes the adverse effects developed by the patients analyzed. The most common ADEs in our cohort were: gastrointestinal complaints, hepatotoxicity and alopecia. We performed univariate analyses considering these toxicities separately and we did not find significant associations (data not shown). The Kaplan–Meier estimates in our cohort of 124 patients showed an association between MTX monotherapy discontinuation due to toxicity and two SNPs in the *ATIC* gene: a significant association with rs16853826 G>A ($p = 0.039$) and a trend toward significance with rs10197559 C>T ($p = 0.055$). For rs16853826, patients with a G/G genotype presented a median time to drug discontinuation of 169 months. This median time was not reached in the remaining patients (Figure 2A). For rs10197559, patients that were carriers of a T allele presented a median time to drug discontinuation of 138 months. This median time was not reached in the remaining patients (Figure 2B).

In silico analysis

According to the Regulome database, rs1476413 *MTHFR* scored as category 1f (likely to affect binding and linked to expression of a gene target). The two SNPs that were linked with rs1476413 (rs3818762 and rs12121543; $r^2 = 1.0$) also scored as category 1f. The rs1643650 *DHFR* presented a minimal binding evidence, although five other SNPs that were highly correlated with this SNP ($r^2 = 1.0$; rs1677636, rs844370, rs863215, rs1677626 and rs1478834) scored as category 1f. The application of the Alamut software indicated that rs16853826 *ATIC* abolished a putative acceptor

site in the position c.1227+1538 (NM_004044.4) with the following scores: 83.71 Human Splicing Finder (range: 0–100), 3.71 MaxEnt (range: 0–16) and 85.41 SpliceSiteFinder-like (range: 0–100).

Discussion

In the present study we found that two SNPs in the *MTHFR* gene, rs17421511 and rs1476413, and one in the *DHFR* gene, rs1643650, were significantly associated with response to MTX treatment in rheumatoid arthritis assessed using the EULAR response criteria. We also found that two SNPs in the *ATIC* gene, rs16853826 and rs10197559, were associated with toxicity.

Regarding response, most studies evaluating the pharmacogenomic role of the *MTHFR* gene in RA patients treated with MTX analyzed two functional variants: C677T (rs1801133; p.Ala222Val) and A1298C (rs1801131; p.Glu429Ala). Two recent meta-analyses reviewed the results from these studies. The meta-analysis by Lee *et al.* included eight studies, with a total of 1514 patients with RA [23]. They did not find any association between the C677T and A1298C variants and the toxicity and efficacy of MTX in RA patients. A similar conclusion was reached in the meta-analysis by Owen *et al.* [24]. They considered 17 studies, including the eight studies contained in the Lee *et al.* meta-analysis. The authors also analyzed their own patient cohort. They analyzed the C677T variant in 1375 patients for efficacy and in 2043 patients for toxicity. Regarding the A1298C polymorphisms, they revised data from 1140 patients for efficacy and from 1239 cases for toxicity, and reported that the *MTHFR* C677T and A1298C variants are not reliable predictors of outcome in RA patients treated with MTX. In concordance with the abovementioned meta-analyses, we did not find a significant association of C677T and A1298C variants with response, but as the present study included an additional set of SNPs we found that rs17421511 and rs1476413 in the *MTHFR* gene can predict MTX efficacy. Pharmacogenetic studies of the *DHFR* gene in RA patients under MTX treatment are scarce. Wessels *et al.* examined two SNPs, -473G>A (rs1650697) and 35289G>A, in a sub-cohort of the BeST trial of 247 RA patients treated with first-line MTX monotherapy [25]. They did not find any association between these polymorphisms and response (DAS44 score at 3 or 6 months). We also analyzed the rs1650697 SNP and confirmed this lack of association. Milic *et al.* showed no association between rs408626 (A-317G *DHFR*) and response defined by EULAR criteria. However, they found an association between the -317AA *DHFR* genotype and lower response to MTX treatment when relative DAS28 was used as a measure [26]. Although we found no association between

Table 4. Univariate and multivariate analysis of SNPs and methotrexate response

refSNP	n	Responders, n (%)	Nonresponders, n (%)	Model	Univariate analysis		Multivariate analysis		
					OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	
MTHFR rs13306561									
A/A	44	32 (72.7)	12 (27.3)	Codominant	1 (reference)	0.77	1 (reference)	0.35	
A/G	14	10 (71.4)	4 (28.6)		1.07 (0.28–4.06)		1.66 (0.36–7.58)		
G/G	3	3 (100)	0 (0)		NA		NA		
				Additive	0.70 (0.23–2.11)	0.77	0.89 (0.27–2.94)	0.85	
MTHFR rs9651118									
T/T	38	25 (65.8)	13 (34.2)	Codominant	1.00 (reference)	0.15	1 (reference)	0.2	
T/C	18	16 (88.9)	2 (11.1)		0.24 (0.05–1.21)		0.29 (0.05–1.61)		
C/C	5	4 (80)	1 (20)		0.48 (0.05–4.75)		0.25 (0.02–2.79)		
				Additive	0.44 (0.14–1.32)	0.11	0.41 (0.14–1.24)	0.09	
MTHFR rs11121832									
C/C	34	29 (85.3)	5 (14.7)	Codominant	1 (reference)	0.06	1 (reference)	0.16	
C/T	21	13 (61.9)	8 (30.1)		3.57 (0.98–13.03)		3.29 (0.80–13.48)		
T/T	6	3 (50)	3 (50)		5.80 (0.90–37.28)		4.53 (0.53–38.34)		
				Additive	2.67 (1.12–6.33)	0.022	2.42 (0.90–6.51)	0.07	
MTHFR rs4846052									
C/C	23	19 (82.6)	4 (17.4)	Codominant	1 (reference)	0.31	1 (reference)	0.36	
C/T	23	17 (73.9)	6 (26.1)		1.68 (0.40–6.97)		1.92 (0.39–9.39)		
T/T	15	9 (60)	6 (30)		3.17 (0.71–14.10)		3.33 (0.62–18.02)		
				Additive	1.78 (0.84–3.77)	0.13	1.83 (0.79–4.24)	0.15	
MTHFR rs17421511									
G/G	41	34 (82.9)	7 (17.1)	Codominant	1 (reference)	0.07	1 (reference)	0.047	
G/A	16	9 (56.2)	7 (43.8)		3.78 (1.05–13.58)		5.51 (1.26–24.09)		
A/A	4	2 (50)	2 (50)		4.86 (0.58–40.55)		5.34 (0.42–68.40)		
				Additive	2.71 (1.08–6.77)	0.029	3.35 (1.10–10.24)	0.024	
G/A– A/A	20	11 (55)	9 (45)	Dominant	3.97 (1.20–13.18)	0.022	5.48 (1.34–22.37)	0.014	
MTHFR rs1801133									
C/C	30	21 (70)	9 (30)	Codominant	1 (reference)	0.57	1 (reference)	0.82	
C/T	23	17 (73.9)	6 (26.1)		0.82 (0.24–2.78)		0.74 (0.19–2.90)		
T/T	8	7 (87.5)	1 (12.5)		0.33 (0.04–3.12)		0.51 (0.04–5.90)		
				Additive	0.67 (0.28–1.59)	0.35	0.73 (0.27–1.98)	0.53	
MTHFR rs1801131									
A/A	30	24 (80)	6 (20)	Codominant	1 (reference)	0.36	1 (reference)	0.19	
A/C	22	16 (72.7)	6 (27.3)		1.50 (0.41–5.48)		3.08 (0.59–16.20)		
C/C	9	5 (55.6)	4 (44.4)		3.20 (0.65–15.70)		4.66 (0.74–29.31)		
				Additive	1.74 (0.80–3.80)	0.16	2.19 (0.89–5.37)	0.08	
MTHFR rs1476413									
C/C	35	29 (82.9)	6 (17.1)	Codominant	1 (reference)	0.08	1 (reference)	0.031	
C/T	19	13 (68.4)	6 (31.6)		2.23 (0.60–8.24)		3.91 (0.80–19.17)		
T/T	7	3 (42.9)	4 (57.1)		6.44 (1.14–36.57)		12.15 (1.47–100.75)		
				Additive	2.47 (1.09–5.61)	0.028	3.56 (1.28–9.91)	0.0086	
C/T–T/T	26	16 (61.5)	10 (38.5)	Dominant	3.02 (0.93–9.85)	0.06	5.32 (1.21–23.41)	0.017	

The values highlighted in bold are statistically significant ($p < 0.05$).
OR: Odds ratio; NA: Not applicable.

Table 4. Univariate and multivariate analysis of 511Ps and methotrexate response (cont.)

refSNP	n	Responders, n (%)	Nonresponders, n (%)	Model	Univariate analysis		Multivariate analysis	
					OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
DHFR rs1650697								
G/G	39	28 (71.8)	11 (28.2)	Codominant	1 (reference)	0.83	1 (reference)	0.67
G/A	21	16 (76.2)	5 (23.8)		0.80 (0.23–2.70)		1.13 (0.30–4.24)	
A/A	1	1 (100)	0 (0)		NA		NA	
				Additive	0.71 (0.22–2.25)	0.83	0.92 (0.27–3.12)	0.89
DHFR rs70991108								
Ins/ins	18	16 (88.9)	2 (11.1)	Codominant	1 (reference)	0.15	1 (reference)	0.16
Ins/del	36	25 (69.4)	11 (30.6)		3.52 (0.69–18.00)		4.14 (0.68–25.24)	
Del/del	7	4 (57.1)	3 (42.9)		6.00 (0.74–48.90)		7.23 (0.69–76.25)	
				Additive	2.48 (0.91–6.74)	0.06	2.72 (0.88–8.39)	0.07
DHFR rs1643650								
T/T	26	16 (61.5)	10 (38.5)	Codominant	1 (reference)	0.16	1 (reference)	0.07
T/C	27	22 (81.5)	5 (18.5)		0.36 (0.10–1.27)		0.24 (0.05–1.09)	
C/C	8	7 (87.5)	1 (12.5)		0.23 (0.02–2.15)		0.14 (0.01–1.65)	
				Additive	0.42 (0.16–1.10)	0.06	0.31 (0.10–0.96)	0.026
T/C–C/C	35	29 (82.9)	6 (17.1)	Dominant	0.33 (0.10–1.08)	0.06	0.22 (0.05–0.88)	0.025
TYMS rs2847153								
G/G	44	35 (79.5)	9 (20.5)	Codominant	1 (reference)	0.26	1 (reference)	0.42
G/A	14	8 (57.1)	6 (42.9)		2.92 (0.8–10.57)		2.60 (0.62–10.87)	
A/A	3	2 (66.6)	1 (33.4)		1.94 (0.16–23.92)		1.81 (0.09–37.64)	
				Additive	1.95 (0.76–5.05)	0.17	1.92 (0.62–5.97)	0.26
TYMS rs2847150								
G/G	33	26 (78.8)	7 (21.2)	Codominant	1 (reference)	0.63	1 (reference)	0.67
G/A	22	15 (68.2)	7 (31.8)		1.73 (0.51–5.90)		1.74 (0.43–7.02)	
A/A	6	4 (66.7)	2 (33.3)		1.86 (0.28–12.31)		1.94 (0.23–16.56)	
				Additive	1.47 (0.64–3.38)	0.37	1.50 (0.59–3.80)	0.4
TYMS rs2847149								
G/G	23	18 (78.3)	5 (21.7)	Codominant	1 (reference)	0.76	1 (reference)	0.62
G/A	26	19 (73.1)	7 (26.9)		1.33 (0.36–4.95)		1.51 (0.32–7.06)	
A/A	12	8 (33.3)	4 (66.7)		1.80 (0.38–8.53)		2.35 (0.41–13.30)	
				Additive	1.34 (0.62–2.90)	0.46	1.53 (0.65–3.63)	0.33
TYMS rs16948305								
C/C	47	34 (72.3)	13 (27.7)	Codominant	1 (reference)	1.00	1 (reference)	0.86
C/T	13	10 (76.9)	3 (20.1)		0.78 (0.19–3.31)		1.03 (0.22–4.93)	
T/T	1	1 (100)	0 (0)		NA		NA	
				Additive	0.67 (0.18–2.56)	1.00	0.90 (0.21–3.87)	0.89
ATIC rs10197559								
C/C	29	20 (69)	9 (31)	Codominant	1 (reference)	0.16	1 (reference)	0.056
C/T	23	16 (69.6)	7 (30.4)		0.97 (0.30–3.18)		0.66 (0.17–2.59)	
T/T	9	9 (100)	0 (0)		NA		NA	
				Additive	0.50 (0.20–1.24)	0.17	0.38 (0.13–1.14)	0.059

This values highlighted in bold are statistically significant (p < 0.05)
 OR: Odds ratios; NA: Not applicable.

Table 4. Univariate and multivariate analysis of SNPs and methotrexate response (cont.)

refSNP	n	Responders, n (%)	Nonresponders, n (%)	Model	Univariate analysis		Multivariate analysis	
					OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
ATIC rs16853782								
A/A	40	29 (72.5)	11 (27.5)	Codominant	1 (reference)	0.79	1 (reference)	0.45
A/G	18	13 (72.2)	5 (27.8)		1.01 (0.29–3.52)		0.97 (0.25–3.73)	
G/G	3	3 (100)	0 (0)		NA		NA	
				Additive	0.71 (0.25–2.03)	0.79	0.70 (0.22–2.24)	0.54
ATIC rs2372536								
C/C	31	26 (83.9)	5 (16.1)	Codominant	1 (reference)	0.18	1 (reference)	0.13
C/G	24	15 (62.5)	9 (37.5)		3.12 (0.88–11.05)		3.96 (0.95–16.51)	
G/G	6	4 (66.7)	2 (33.3)		2.60 (0.37–18.25)		3.24 (0.39–27.01)	
				Additive	1.95 (0.83–4.56)	0.12	2.22 (0.86–5.68)	0.09
ATIC rs12995526								
T/T	18	16 (88.9)	2 (11.1)	Codominant	1 (reference)	0.13	1 (reference)	0.08
T/C	27	17 (63)	10 (37)		4.71 (0.89–24.86)		9.04 (0.92–88.82)	
C/C	16	12 (75)	4 (25)		2.67 (0.42–17.05)		5.94 (0.51–69.42)	
				Additive	1.47 (0.68–3.21)	0.32	1.78 (0.70–4.52)	0.22
ATIC rs7586969								
A/A	21	15 (71.4)	6 (28.6)	Codominant	1 (reference)	0.22	1 (reference)	0.31
A/G	28	19 (67.9)	9 (32.1)		1.18 (0.34–4.07)		0.83 (0.22–3.17)	
G/G	12	11 (91.7)	1 (8.3)		0.23 (0.02–2.17)		0.21 (0.02–2.12)	
				Additive	0.64 (0.28–1.46)	0.28	0.55 (0.22–1.40)	0.20
ATIC rs2177735								
A/A	25	21 (84)	4 (16)	Codominant	1 (reference)	0.26	1 (reference)	0.17
A/G	28	18 (64.3)	10 (35.7)		2.92 (0.78–10.91)		3.97 (0.88–18.05)	
G/G	8	6 (75)	2 (25)		1.75 (0.26–11.99)		2.39 (0.27–20.93)	
				Additive	1.56 (0.68–3.59)	0.29	1.83 (0.70–4.75)	0.21
ATIC rs16853826								
G/G	46	34 (73.9)	12 (26.1)		1 (reference)	0.96	1 (reference)	0.95
G/A	15	11 (73.3)	4 (26.7)		1.03 (0.28–3.86)		0.96 (0.23–3.95)	
CCND1 rs9344								
G/G	19	16 (84.2)	3 (15.8)	Codominant	1 (reference)	0.18	1 (reference)	0.2
G/A	30	19 (63.3)	11 (36.7)		3.09 (0.73–13.03)		3.80 (0.71–20.15)	
A/A	12	10 (83.3)	2 (16.7)		1.07 (0.15–7.54)		1.53 (0.16–14.41)	
				Additive	1.15 (0.51–2.59)	0.73	1.33 (0.51–3.48)	0.56
CCND1 rs649392								
A/A	20	14 (70)	6 (30)	Codominant	1 (reference)	0.17	1 (reference)	0.14
A/G	28	19 (67.9)	9 (32.1)		1.11 (0.32–3.83)		0.86 (0.21–3.54)	
G/G	13	12 (92.3)	1 (7.7)		0.19 (0.02–1.85)		0.14 (0.01–1.52)	
				Additive	0.59 (0.26–1.35)	0.20	0.47 (0.18–1.22)	0.11

The values highlighted in bold are statistically significant ($p < 0.05$).
OR: Odds ratio; NA: Not applicable.

this SNP and the response defined by any clinical criteria (EULAR, DAS28, SDAI or CDAI scores), we identified a significant association between *DHFR* rs1643650 and response. Owen *et al.* analyzed rs1643657 in the *DHFR* gene, which is in linkage disequilibrium with

rs1643650 ($r^2 = 1$), and found no association with response. However, they found three SNPs (rs1643657, rs10072026 and rs12517451) significantly associated with risk of cessation of treatment due to ADEs [27]. In 2007, Wessels *et al.* designed a pharmacogenetic model

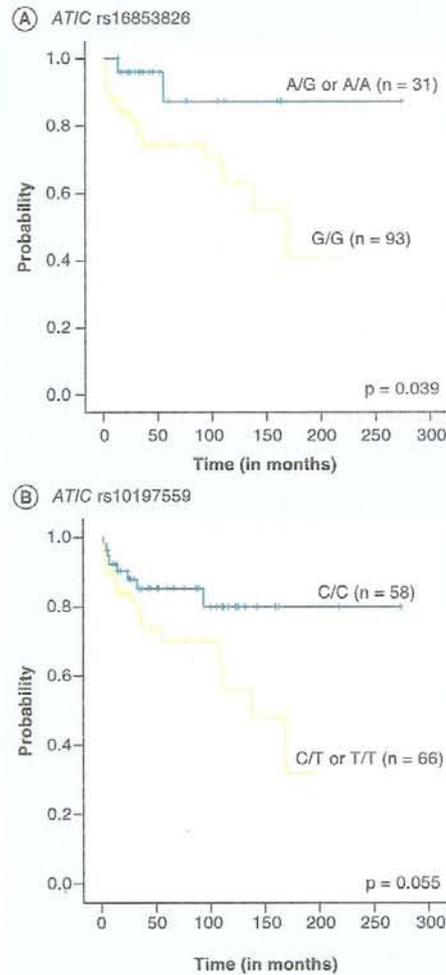


Figure 2. Probability of methotrexate discontinuation due to toxicity according to genetic markers. (A) rs16853826; the blue line represents AG/AA patients, and the red line represents GG patients; (B) rs10197559; the blue line represent CC patients and the red line represents CT/TT patients. Please see color figure at www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/pgs.14.67

for the probability of response to MTX in patients with RA [28]. Recently, this group of researchers showed that the model was a good predictor of nonresponse in naive recent-onset RA patients treated with DMARDs [29]. This model includes four SNPs as variables (*AMPD1* rs17602729, *AT1C* rs2372536, *ITPA* rs1127354 and *MTHFD1* rs17850560). One of them, *AT1C* rs2372536, was also analyzed in our study, although we did not find any association with response.

The combined genotypes of *MTHFR* and *DHFR* in patients showing response to MTX allowed delineation of what we have called 'a responder genotype'. This genetic parameter, that identifies 94.4% of responder patients, indicates that genetic variants of the *MTHFR* and *DHFR* genes have an additive effect on response. The three polymorphisms that define this responder genotype are tagSNPs located in noncoding regions of the two genes. Although the biological role of these SNPs is unknown, the *in silico* data indicate that they could have some regulatory function in the target gene expression.

Concerning the development of ADEs, a recent review of 347C>G SNP (rs2372536; p.Thr116Ser) in the *AT1C* gene on MTX toxicity showed contradictory findings [30]. Three studies evidenced an association while three other papers found no association between the SNP and toxicity. In the present study, we evaluated toxicity as the period from the start of MTX monotherapy to drug withdrawal due to any significant ADE. This approach has two advantages: it avoids fragmentation of the cohort as it considers all the ADEs together, and it takes into account a relevant measurement for clinicians: the period of time elapsed until drug discontinuation due to the appearance of toxicity. Using this approach, we did not find an association with the rs2372536 *AT1C* variant. However, we found a significant association and a trend towards significance between toxicity and two tagSNPs in the *AT1C* gene, rs16853826 and rs10197559, both located in intronic regions. Although the biological function of these SNPs has not been determined, the data from the Alamut software predicts that the tagSNPs in the *AT1C* gene could modify the splicing process.

The vast majority of MTX pharmacogenetic studies in RA focused on a small number of functional SNPs in genes involved in the drug's mechanism of action. This approach yielded inconclusive results. The rationale of our study was to have better coverage of these candidate genes through the study of their tagSNPs along with the abovementioned functional SNPs. The low number of patients included in our study may account for the lack of significance when multiple comparison correction was applied. Despite this limitation, the homogeneity of the clinical criteria was guaranteed as all patients were evaluated by only two rheumatologists, both of whom were blinded to the genetic results.

Conclusion

A confirmation study would increase the value of the present results, strengthen our observation, and provide a solid base for genotyping as a part of therapy individualization. Patients with RA who have a high tolerance of MTX would likely benefit from an increase in dose, while patients with a partial response

or adverse effects to the drug would require a biological agent as first-line treatment.

Future perspective

The genetic variants identified in this study have the potential to be used as predictive markers of response and toxicity in RA patients under MTX monotherapy.

Acknowledgements

The authors thank C Newey for English language editing.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by a grant from the Catalan Society for Rheumatology. The authors have no other relevant

affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Executive summary

Background

• Methotrexate is the cornerstone of rheumatoid arthritis therapy.

Genetic determinants & response

• Genetic variants in *MTHFR* and *DHFR* genes delineate a 'responder genotype' of response.

Genetic determinants & toxicity

• Genetic variants in the *ATIC* gene act as pharmacogenetic markers of toxicity.

References

Papers of special note have been highlighted as:

* of interest

- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 365(23), 2205–2219 (2011).
- Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann. Rheum. Dis.* 73(3), 492–509 (2014).
 - These recommendations are intended to inform rheumatologists, patients, national rheumatology societies and other stakeholders about the European League Against Rheumatism (EULAR) consensus.
- Combe B, Landewe R, Lukas C *et al.* EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCIIT). *Ann. Rheum. Dis.* 66(1), 34–45 (2007).
- Saag KG, Teng GG, Patkar N *et al.* American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of non-biologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 59(6), 762–784 (2008).
- Yazici Y. Long-term safety of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 28(Suppl. 61), S65–S67 (2010).
- Weinblatt ME, Kaplan H, Germain BF *et al.* Methotrexate in rheumatoid arthritis. A five-year prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 37(10), 1492–1498 (1994).
- Kinder AJ, Hassell AB, Brand J *et al.* The treatment of inflammatory arthritis with methotrexate in clinical practice: treatment duration and incidence of adverse drug reactions. *Rheumatology (Oxford)* 44(1), 61–66 (2005).
- Aletaha D, Smolen JS. The rheumatoid arthritis patient in the clinic comparing more than 1,300 consecutive DMARD courses. *Rheumatology (Oxford)* 41(12), 1367–1374 (2002).
- Maetzel A, Wong A, Strand V *et al.* Meta-analyses of treatment termination rates among rheumatoid arthritis patients receiving disease modifying anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)* 39(9), 975–981 (2000).
- Albrecht K, Müller-Ladner U. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 28(Suppl. 61), S95–S101 (2010).
- Mikkelsen TS, Thorn CF, Yang JJ *et al.* PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenet. Genomics* 21(10), 679–686 (2011).
- Galivan J. Evidence for the cytotoxic activity of polyglutamate derivatives of methotrexate. *Mol. Pharmacol.* 17(1), 105–110 (1980).
- Gorlick R, Goker E, Trippett T *et al.* Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 335(14), 1041–1048 (1996).
- Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an *in vivo* model of inflammation. *J. Clin. Invest.* 92(6), 2675–2682 (1993).
- Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH *et al.* Modified disease-activity scores that include 28-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38(1), 44–48 (1995).
- Aletaha D, Smolen J. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23(5 Suppl. 39), S100–S108 (2005).

- 17 Fransen J, van Riel PL. The disease activity score and the EULAR response criteria. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23(Suppl. 39), S93–S99 (2005).
- 18 Dulucq S, St-Onge G, Gagné V et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 111(7), 3692–3700 (2008).
- 19 Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell. Struct. Funct.* 20(3), 191–197 (1995).
- 20 Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res.* 63(18), 6004–6007 (2003).
- 21 Regulome database. <http://regulome.stanford.edu>
- 22 Boyle AP, Hong EL, Hariharan M et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 22(9), 1790–1797 (2012).
- 23 Lee YH, Song GG. Associations between the C677T and A1298C polymorphisms of *MTHFR* and the efficacy and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin. Drug. Investig.* 30(2), 101–108 (2010).
- This meta-analysis, which included patients with rheumatoid arthritis (RA), found no association between the C677T and A1298C polymorphisms of *MTHFR* and the toxicity and efficacy of methotrexate in RA.
- 24 Owen SA, Lunt M, Bowes J, Hider SL et al. *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.* 13(2), 137–147 (2013).
- Available evidence suggests that the *MTHFR* C677T and A1298C gene polymorphisms are not reliable predictors of response to methotrexate (MTX) treatment in RA patients.
- 25 Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans RT et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum.* 54(4), 1087–1095 (2006).
- 26 Milic V, Jekic B, Lukovic L et al. Association of dihydrofolate reductase (*DHFR*) -317A genotype with poor response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 30(2), 178–183 (2012).
- 27 Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment. *Pharmacogenomics J.* 13(3), 227–234 (2013).
- Genetic variations in several key MTX pathway genes may influence response to MTX in RA patients.
- 28 Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S et al. A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56(6), 1765–1775 (2007).
- 29 Fransen J, Kooloos WM, Wessels JA, Huizinga TW, Guchelaar HJ, van Riel PL, Barrera P. Clinical pharmacogenetic model to predict response of MTX monotherapy in patients with established rheumatoid arthritis after DMARD failure. *Pharmacogenomics* 13(9), 1087–1094 (2012).
- 30 Malik F, Ranganathan P. Methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis: a status report. *Pharmacogenomics* 14(3), 305–314 (2013).
- MTX pharmacogenetics in RA remains a muddled field, mostly owing to inconsistent results from several small underpowered studies.

3.2 METHOTREXATE PHARMACOKINETIC GENETIC VARIANTS ARE ASSOCIATED WITH OUTCOME IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Patricia Moya, Juliana Salazar, María Jesús Arranz, César Díaz-Torné, Elisabeth del Río, Jordi Casademont, Hèctor Corominas, Montserrat Baiget.

Pharmacogenomics 2015. Aceptado para publicación

RESUMEN

- Antecedentes: El metotrexato es el fármaco más frecuentemente utilizado como tratamiento de la artritis reumatoide, aunque su eficacia y aparición de efectos adversos difiere entre los pacientes.

- Objetivo: Evaluar si variantes genéticas en los genes que participan en la farmacocinética del fármaco se asocian con la eficacia y toxicidad en pacientes con artritis reumatoide en tratamiento con metotrexato en monoterapia.

- Métodos: Se analizaron 28 polimorfismos en genes los genes SLC19A1/RFC1, ABCB1, FPGS y GGH.

- Resultados: Se estudiaron 194 pacientes con artritis reumatoide tratados con metotrexato en monoterapia. Los análisis mostraron una asociación significativa entre la respuesta y dos variantes en FPGS, rs10987742 y rs10106 ($p = 0,033$ y $p = 0,041$, respectivamente). Los análisis también mostraron una asociación significativa entre la variante rs10106 de FPGS y la supervivencia del MTX ($p = 0,005$) y la toxicidad ($p = 0,021$). Por último, tres SNPs en el gen ABCB1, rs868755, rs10280623 y rs1858923, se asociaron significativamente con una mayor toxicidad ($p = 0,025$, $p = 0,048$ y $p = 0,031$, respectivamente).

- Conclusión: Variantes genéticas en FPGS y ABCB1 pueden influir en la respuesta y toxicidad del MTX en los pacientes con artritis reumatoide que reciben tratamiento en monoterapia.

Palabras claves: Artritis reumatoide, Metotrexato, Transportador de folatos 1 (SLC19A1/RFC1), ATP-Binding Cassette Sub-Familia B Miembro 1 (ABCB1), Folilpoliglutamato Sintetasa (FPGS), Gamma-Glutamil Hidrolasa (GGH), Farmacogenética.

RE: Pharmacogenomics - peer-reviewer's comments

Sarah Jones [redacted]@futuremedicine.com]

Enviat el: dilluns, 5 / octubre / 2015 17:25

Per a: Juliana Salazar Blanco

Dear Juliana,

Thank you for making these revisions to your manuscript. I am pleased to let you know that your article has been accepted for publication. I have scheduled your paper for publication in the next available issue of the journal and a member of our production team will be in touch with the proofs shortly.

In the meantime, if you have any queries, please do not hesitate to contact me.

Best wishes

Sarah

Sarah Jones

Commissioning Editor

Future Medicine

part of **future science group**

Unitec House, 2 Albert Place, London, N3 1QB, UK

+44 (0)20 8371 6090 | www.futuremedicine.com

Interested in a **FREE TRIAL** to one of our journals? Contact info@futuremedicine.com quoting EML213X.

Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients

ABSTRACT

Background: Methotrexate (MTX) is the most used drug for the treatment of rheumatoid arthritis (RA) although outcome differs among patients. **Aim:** To evaluate whether polymorphisms in pharmacokinetic genes are associated with outcome in RA patients receiving MTX. **Methods:** We analyzed 28 SNPs in *SLC19A1/RFC1*, *ABCB1*, *FPGS* and *GGH* genes. **Results:** We studied 194 RA patients receiving MTX monotherapy. Two *FPGS* SNPs, rs10987742 and rs10106, were associated with response ($p=0.033$ and $p=0.041$, respectively). The *FPGS* rs10106 variant was also associated with MTX survival ($p=0.005$) and toxicity ($p=0.021$). Three *ABCB1* SNPs, rs868755, rs10280623 and rs1858923, were associated with toxicity ($p=0.025$, $p=0.048$ and $p=0.031$, respectively). **Conclusion:** *FPGS* and *ABCB1* genetic variants can influence the outcome in RA patients receiving MTX monotherapy.

Key Words: Rheumatoid Arthritis (RA), Methotrexate (MTX), Folate Transporter 1 (*SLC19A1/RFC1*), ATP-Binding Cassette Sub-Family B Member 1 (*ABCB1*), Folylpolylglutamate Synthase (*FPGS*), Gamma-Glutamyl Hydrolase (*GGH*), Pharmacogenetics.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a common chronic disease with a worldwide prevalence of 0.5–1%, and a mean annual incidence of 0.02–0.05%. It is characterized by synovial inflammation and hyperplasia, autoantibodies production (rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies), cartilage and bone destruction and systemic features, including cardiovascular, pulmonary and skeletal. RA is associated with progressive disability, systemic complications, early death, and high socioeconomic costs.

Treatment of RA involves the suppression of inflammation and the therapeutic goal is to achieve remission or a low disease activity (1).

Methotrexate (MTX) is the disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD) most frequently used for the treatment of RA (2–5). However, 30-50% of patients do not respond and up to 35% develop severe side effects, including cytopenia, hepatotoxicity and interstitial pneumonitis, leading to withdrawal of the treatment (6–11). New biological therapies are more efficient than MTX, but they are expensive and their use is also associated with increased toxicity levels (12). Identifying pharmacogenetic markers predisposing to treatment response or to the development of side effects will help to improve MTX therapy outcomes.

MTX, a structural analogue of folic acid, is a drug that is transformed into active polyglutamated metabolites within cells. MTX is transported into the cell by folate transporter 1 (SLC19A1/RFC1). Efflux of the drug from the cell is controlled by members of the ATP-binding cassette (ABC) family of transporters, including ABCB1. Within the cell, MTX is converted into MTX polyglutamates by the enzyme folylpolyglutamate synthase (FPGS), which catalyses polyglutamylation of methotrexate. This process can be reversed by the enzyme γ -glutamyl hydrolase (GGH), which catalyzes the hydrolysis of folyl- and antifolylpoly-gamma-glutamates derivatives. MTX and its polyglutamates exert their action by inhibiting various enzymes involved in different pathways (purine and pyrimidine metabolism, and the methionine pathway) and in promoting the release of adenosine (Figure 1). *In vitro*, *in vivo*, and clinical data show that the anti-inflammatory effect of MTX in RA is predominantly mediated by adenosine release into the extracellular space after treatment. Adenosine could alter the secretion of molecules that promote inflammation, such as chemokines, by interacting with specific adenosine receptors expressed on the inflammatory cells surface (13).

Genetic variations in pharmacokinetic genes involved in MTX metabolism can be major determinants of the variability in clinical response, both in terms of response and toxicity. Early studies described these associations in patients under MTX monotherapy (14). However, these findings were not replicated in later studies (15–17). These discrepancies may be explained by the difference in the genetic variants investigated and/or in the methods used to assess clinical outcomes. A comprehensive coverage of the genes analyzed and a more rigorous evaluation of the effectiveness of the drug is required. The aim of the present study was to evaluate whether genetic variants in the pharmacokinetic genes *SLC19A1/RFC1*, *ABCB1*, *FPGS* and *GGH* are associated with outcome in RA patients receiving methotrexate monotherapy.

PATIENTS AND METHODS

Study population

The patients included in the study were Spanish Caucasians who met the European League Against Rheumatism (EULAR)/American College of Rheumatology (ACR) criteria (18) for the diagnosis of RA. They were recruited consecutively when visited at the Rheumatology Units at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Hospital Moises Broggi in Barcelona, Spain, from January 1999 to June 2014. The institutional ethics committees at each centre approved this study and all patients signed an informed consent for sample collection and analysis.

Inclusion criteria were diagnosis of RA and treatment with MTX monotherapy. Exclusion criteria were patients receiving simultaneous treatment with other DMARDs - aurotherapy, azathioprine, sulphasalazine, leflunomide and chloroquine - and/or the use of >10mg/day of prednisone or equivalent during the period of the MTX monotherapy. All the patients received MTX monotherapy, administered at standard doses (7.5-25 mg/week), either orally or subcutaneously, and received

supplementation with folic or folinic acid (5mg and 15mg, respectively). Clinical data (gender, age at disease onset, duration of MTX treatment, time interval from disease onset to MTX treatment, rheumatoid factor (RF) status, anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) status, concomitant use of corticoids and folic acid) were collected from the clinical records.

Disease activity was measured according to three indices: the DAS28 (Disease Activity Score) (19), the SDAI Index (Simplified Disease Activity Index) and the CDAI Index (Clinical Disease Activity Index) (20). MTX response was evaluated only in those patients who maintained the therapy for at least 6 months. It was measured according to three criteria: i) the EULAR response criteria (21), ii) the difference between DAS28 at baseline and at 6 months of treatment, and iii) MTX monotherapy survival. The EULAR response criteria are as follows: when the DAS28 score at end point is ≤ 3.2 and improvement from baseline is ≥ 1.2 , the response is defined as good; when DAS28 at end point is between 3.2 and 5.1, together with an improvement between 0.6 and 1.2 the response is defined as good/moderate; and when DAS28 at end point is higher than 5.1 and the improvement is ≤ 0.6 over the baseline DAS28, the response is defined as poor. For data analysis, we considered patients classified as good or moderate as responders and patients classified as poor as nonresponders. MTX monotherapy survival was defined as the time from the beginning of MTX monotherapy until its withdrawal or the addition of another drug.

Patients were classified according to whether or not they had any side effects during therapy with MTX monotherapy. All side effects were collected from the start of treatment until withdrawal due to adverse effects or until additional treatments were introduced if MTX monotherapy was ineffective. Table 1 shows the criteria to define these events.

Genetic studies

We analyzed twenty-eight single nucleotide polymorphisms (SNPs) in four genes (*SLC19A1/RFC1*, *ABCB1*, *FPGS*, *GGH*) involved in the transport, activation and inactivation through polyglutamylation of MTX. The SNPs included in the study were selected according to published data and its condition of being a TaqSNP (a SNP that represents a [haplotype](#)). This strategy avoids the study of every individual SNP in a region of the genome, and reduces the cost and time of the genotyping process. The TaqSNPs were selected from the HapMap genome browser (<http://www.hapmap.org>), and filtered with the Haploview software (version 4.2) according to an r^2 cut-off greater than 0.8 and a minor allele frequency (MAF) greater than 10% in Caucasians. Table 2 shows the characteristics of the SNPs studied.

Genomic DNA was automatically extracted from peripheral blood samples using the salting out procedure (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany). Genotyping was performed by means of real-time PCR using a 48.48 dynamic array on the BioMark™ system (Fluidigm, San Francisco, CA, USA) and was read with the Fluidigm SNP Genotyping Analysis software v.4.1.2. The DNA samples and the TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mixes were prepared according to the manufacturer's instructions.

***In silico* analyses**

Two methods were used to examine whether the genetic variants could alter gene function in a biological relevant manner: i) the software Alamut version 2.3 (Interactive Biosoftware, Rouen, France) for splicing alterations (acceptor and donor splice sites), and ii) the Regulome database (<http://regulome.stanford.edu>) (22) to identify DNA features and regulatory elements in non-coding regions of the human genome.

Statistical analysis

Linear regression analyses and Pearson chi-square tests were used to investigate associations with response as measured by DAS28 difference at 6 months, and with toxicity, respectively. Generalized linear models considering response or toxicity as the dependent variable, and the SNP genotypes, erosive disease, C reactive protein (CRP) and the number of previously failed DMARDs as predictor variables were performed. The Kaplan-Meier method using the log-rank test was performed to evaluate the influence of SNPs on MTX monotherapy survival. Multivariate analyses investigating the influence of selected covariates on the duration of MTX monotherapy were performed using Cox regression models. Haplotype analyses for each gene were conducted to examine the influence of specific allelic combinations on response and toxicity. The results were considered statistically significant when two-sided p -values were less than 0.05. No adjustments were performed for multiple testing. Hardy-Weinberg equilibrium of each analyzed SNP was assessed using a chi-square test. All statistical analyses were done using SPSS (version 19.0, IBM), Epi InfoTM7 and PLINK (version 1.07) (23) statistical packages.

RESULTS

Clinical results

We studied 194 RA patients (138 women and 56 men) treated with MTX in monotherapy. Table 3 shows their baseline characteristics. All the patients were receiving folic or folinic acid during MTX treatment. In 59.8% of patients, MTX monotherapy was maintained throughout the study. In the remaining patients, the drug was withdrawn due to adverse events (26.3% of patients) or due to the administration of additional treatments when MTX monotherapy was ineffective (13.9% of patients).

We evaluated the effectiveness of treatment at 6 months using the EULAR response criteria and DAS28 in 76 patients. The average weekly dose of MTX in these patients

was 12.33 mg (± 4.10). According to the EULAR response criteria, 35 (46%) patients were classified as good responders and 41 (54%) as nonresponders. At the onset of treatment, the mean DAS28 was 5.05 (± 1.32) and at 6-month follow up the mean DAS28 decreased and was 3.45 (± 1.22). We also measured the SDAI and CDAI indexes in 67 patients and 71 patients, respectively. At the onset of treatment, the mean SDAI was 23.83 (± 13.89) and the mean CDAI was 21.72 (± 12.45). We also observed a decrease in these values at 6-month follow up, the mean SDAI was 10.24 (± 9.20) and mean CDAI was 9.49 (± 8.54).

Eighty-three of the 194 patients (42.8%) developed at least one adverse effect related to MTX administration. The most common events were gastrointestinal complaints and hepatotoxicity (15.4% and 13.8%, respectively) (Table 3).

This sample had a 75-90% power to detect genetic associations with MTX monotherapy and with toxicity ($OR \geq 2.0$ and $MAF = 0.15-0.40$, respectively), and a 65-80% power to detect associations with response ($OR \geq 2.5$ and $MAF = 0.15-0.40$).

Genotyping results

MTX response analyses

Univariate analyses showed an association between two SNPs in the *FPGS* gene, rs10987742 G>A and rs10106 T>C, and MTX response. At 6 months, patients with the rs10987742-A/A genotype had a mean difference in DAS28 of -4.84 (± 1.64), patients with the G/A genotype had a mean difference of -1.72 (± 1.35), and patients with G/G genotype had a mean difference of -1.52 (± 1.37) ($p = 0.033$). For the rs10106 variant, the mean difference in DAS28 was -2.12 (± 1.56) in patients with the T/T genotype, -1.59 (± 1.49) in patients with the T/C genotype, and -1.15 (± 0.97) in patients with the C/C genotype ($p = 0.041$). Table 4 shows the results of these univariate analyses. In the

multivariate analyses considering erosive disease, CRP and the number of previously failed DMARDs as predictor variables, we found a trend towards significance with rs10987742 ($p=0.059$).

Haplotype analyses of the three *FPGS* gene polymorphisms studied (rs10987742|rs10760502|rs10106) showed that the AGT haplotype was significantly associated with the MTX response ($p=0.017$) (Table 5). To further investigate the possible interaction between *FPGS* polymorphisms, we conducted an additional generalized linear model. We considered MTX response as the dependent variable, and the erosive disease, CRP, the number of previously failed DMARDs and a factorial covariate combining the three *FPGS* polymorphisms as covariates. This analysis showed no significant association ($p=0.68$).

MTX monotherapy evaluation

Table 4 shows the Kaplan Meier estimates of the MTX survival. We found a significant association with rs10106 T>C and a trend towards significance with rs10760502 in the *FPGS* gene. For rs10106, patients with a rs10106-T/T genotype presented a longer mean time on MTX monotherapy (144 months) than patients with T/C (94 months), and C/C (77 months) genotypes ($p= 0.005$). Similarly, patients with rs10760502-A/A genotypes presented a relatively longer mean time on MTX monotherapy (142 months) than patients with G/A (107 months) and G/G genotypes (88 months) ($p=0.064$). In the multivariate Cox regression analyses, both *FPGS* variants were statistically significant, rs10106 (OR: 1.46; 95% CI, 1.11–1.93; $p=0.007$) and rs10760502 (OR: 0.71; 95% CI, 0.53–0.95; $p=0.02$).

In addition, two variants in the *ABCB1* gene had a statistically significant association with MTX survival: rs10264990 T>C and rs868755 G>T. Carriers of the rs10264990-T allele were on MTX monotherapy (110 months) for longer than patients with the C/C

genotype (63 months) ($p=0.026$ in a recessive model). Carriers of the rs868755-T allele were taking MTX monotherapy (118 months) for longer than patients with G/G genotype (85 months) ($p=0.023$ in a dominant model). None of these associations remained significant after multivariate analyses.

MTX toxicity analyses

Table 6 shows the results of the univariate analyses. Three SNPs in the *ABCB1* gene were significantly associated with toxicity: rs868755 G>T, rs10280623 T>C, and rs1858923 A>G. For rs868755, side effects were more frequent in homozygous T/T patients (65.5%) than in heterozygous (40.2%) patients and wild type patients (36.8%) ($p=0.025$). For rs10280623, patients with the rs10280623-T/T genotype had more side effects (47.1%) than patients carrying the C allele for the variant (31.5%) ($p=0.048$ in a dominant model). For rs1858923, carriers of the G allele presented more side effects (47.8%) than patients with the A/A genotype (31.0%) ($p=0.031$ in a dominant model). Multivariate analyses adjusting for all the relevant clinical variables revealed associations between toxicity and two of the mentioned *ABCB1* variants, rs868755 ($p=0.038$) and rs10280623 ($p=0.011$). The haplotype analyses showed an association between an *ABCB1* haplotype and toxicity ($p=0.017$) (Table 5).

Additionally, rs10106 T>C in the *FPGS* gene was also associated with toxicity. Patients with the rs10106-TT genotype (55%) presented more side effects than carriers of the C allele (45%) ($p=0.021$ in a dominant model). This association remained statistically significant in the multivariate analyses ($p=0.045$). The haplotype analyses showed an association between an *FPGS* haplotype and toxicity ($p=0.032$) (Table 5).

Finally, a variant in the *GGH* gene, rs13248452, was statistically associated with toxicity ($p=0.017$ in a recessive model), although in the multivariate analyses it did not retain significance.

***In silico* analysis**

We used the Regulome database and the Alamut software to predict the functional effects of SNPs that showed a significant association between toxicity and/or response in both univariate and multivariate analyses. Considering the *FPGS* gene, rs10760502 and rs10106 scored as category 4 and 5, respectively (Regulome database). These categories include SNPs that could modify the expression of the gene by altering the binding of some transcription factors and creating some DNase I hypersensitive sites. With regard to the *ABCB1* gene, the Alamut software did not predict any functional alterations for the SNPs rs10280623 and rs868755. However, two additional SNPs that are in strong linkage disequilibrium (LD) with those included in the study showed interesting results. According to the Alamut software: i) rs2235015, in LD with rs10280623 ($r^2=1.0$), abolished a putative donor site in the position c.287-26 in intron 5 of the gene; and ii) rs4148738, in LD with rs868755 ($r^2=0.85$), generated a putative acceptor site in the position c.2482-2234 in intron 21 of the *ABCB1* gene.

DISCUSSION

In the present study, we found that genetic variants in the *FPGS* and *ABCB1* genes were associated with outcome in RA patients receiving methotrexate (MTX) monotherapy. In the *FPGS* gene, two SNPs, rs10106 and rs10987742, were significantly associated with response while rs10106 was also significantly associated with toxicity. Additionally, rs10106 and rs10760502, showed a significant association with MTX survival. In the *ABCB1* gene, three SNPs: rs868755, rs10280623, and rs1858923, were significantly associated with toxicity.

Information about the pharmacogenetic role of the *FPGS* genetic variants in RA patients under MTX monotherapy is scarce and controversial. No significant associations between genetic variants and outcome were found in two studies in

Caucasian RA patients (24,25) or in a Japanese study that included patients with articular-type juvenile idiopathic arthritis (26). Two recent publications have suggested that the *FPGS* is involved in the MTX outcome. Owen *et al* analyzed a large cohort of patients (n=309) and reported that two SNPs (rs1054774 and rs4451422) showed a trend to significance with the development of adverse events (27). Davis *et al* considered the involvement of the *FPGS* gene in the appearance of toxicities and they found a significant association ($p < 0.0001$) when considering the interaction between *FPGS* rs7033913 and *GGH* rs11988534 SNPs (28).

We found a clear relationship between the *FPGS* genotype and outcome in RA patients under MTX monotherapy. From the clinical point of view, while previous studies defined the response as the cut-off of the DAS28 value (a bimodal variable) (24,25), we measured the clinical response evaluating the difference between the initial DAS28 value and the value at 6 months (a continuous variable). This difference guarantees the reliability of this parameter. From a pharmacogenetic point of view, the Regulome database scored the two SNPs in the *FPGS* gene associated with response as genetic variations able to modify gene expression by altering the binding of some transcription factors and creating some DNase I hypersensitive sites. The involvement of the *FPGS* gene was also reinforced by the existence of a response-related haplotype that included all the analyzed variants in the gene. In tune with all these findings, patients who had a better response also presented a longer MTX monotherapy survival (rs10106-TT and rs10760502-AA). Finally, we also found an association between rs10106 and toxicity.

Regarding the pharmacogenetic role of the *ABCB1* gene, several studies have analyzed the rs1045642 variant (C3435T) in RA patients receiving MTX monotherapy. The results were not conclusive as they showed: i) significant associations between the TT genotype and an increase in response to MTX treatment in RA (29–31) ii) a

significant association between a TT genotype with a lack of response (32) and iii) no significant associations with MTX response (33–35). A similar situation occurred when rs1045642 was considered as a marker of toxicity. Two studies (33,34) showed that the rs1045642-T allele significantly increased the risk of MTX toxicity while Plaza-Plaza *et al* observed that it was the C allele that was associated with toxicity (36). Other studies showed no significant differences in MTX toxicity and the variant (32,35,37). The results in the present study did not help to clarify the situation: we did not find a significant association between the rs1045642 variant and the outcome in the 194 patients analyzed.

Two other SNPs in the *ABCB1* gene that have also been studied in the literature are rs1128503 (T1236C) and rs2032582 (G2677T/A). The former is a synonymous polymorphism that has been analyzed in only two RA cohorts of patients. Kato *et al* evaluated response to MTX in a sample of fifty-five patients and did not find any association with response (30). However, Ranganathan *et al* found that the TT genotype was significantly associated with overall toxicity (37). The other SNP, G2677T/A, is a non-synonymous polymorphism that can lead to two amino acid changes (alanine by threonine or by serine in position 899). Bohanec *et al* conducted pharmacogenetic studies of this polymorphism and they did not find any significant results (33). More recently, Kato *et al* showed that patients with 2677AA/AT/TT genotypes had a significantly better response than patients with 2677GG/GA/GT genotypes (30).

Our analyses, that included sixteen TaqSNPs in the *ABCB1* gene, did not show any significant association with response, although three SNPs in this transporter gene (rs868755, rs10280623, and rs1858923) were significantly associated with toxicity. Interestingly, the SNP rs868755 is known to be in strong linkage disequilibrium with rs1128503 and rs2032582 ($r^2=0.941$ and $r^2=0.885$, respectively). Therefore, the

significant association that we obtained between rs868755 and toxicity is in agreement with previous results (37). *In silico* studies did not suggest any functional role for rs868755 and rs10280623. But as they are in linkage disequilibrium with two other SNPs (rs4148738 and rs2235015, respectively), we also analyzed their possible functionality *in silico*. The Alamut software indicated that the two variants could influence the mechanism of splicing by altering putative acceptor sites. This alteration could decrease the enzymatic activity of the ABCB1 with a subsequent decrease in the efflux of MTX from the cell. The toxicity associated with these SNPs could be attributed to this event.

We also studied the role of several variants in *SLC19A1/RFC1* and *GGH* genes as markers of outcome. The rs1051266 (G80A) variant in *SLC19A1/RFC1* gene has been extensively studied in RA patients. It has been associated with the response in two studies (38,39) and with toxicity in two other (33,40).. However, other studies analysing this variant did not show any significant associations with outcome (17,26,30,32,35,36). Owen *et al* analyzed several variants covering the *SLC19A1/RFC1* gene region and described an association between six of these variants and MTX response (27). Our findings do not support the role of the *SLC19A1/RFC1* gene, as we did not find any association between the variants analyzed (including the rs1051266 variant) and response or toxicity. In relation to the *GGH* gene, the rs12681874 variant has been associated with response (27), and two other variants, rs719235 (41) and rs1800909 (26) with toxicity in patients with RA. However, the most studied variant in this gene, rs11545078, has not been associated with outcome in several studies (26,30,41). In our study, we found the variant rs13248452 was associated with toxicity, but this association did not remain significant when adjusting for the relevant clinical variables.

Our study has some limitations and replication studies in new cohorts of patients are needed to validate our results. Moreover, additional studies should be performed to

determine the functionality of the genetic variants associated with MTX monotherapy response and toxicity in patients with RA.

We evaluated different genetic variants in four pharmacokinetic genes as biomarkers of outcome in RA patients receiving MTX monotherapy. In the study design we improved two methodological aspects that guarantee the reliability of our results. First, we designed a wide set of markers to ensure the best coverage of the four genes analyzed, and secondly, we refined the clinical information by studying three robust variables: response as measured by DAS28 difference at 6 months, toxicity according to the development of well-defined adverse side effects, and MTX survival. Identifying novel associations between genetic variants in *FPGS* and *ABCB1* genes and outcome in RA patients under MTX monotherapy is a further step towards personalized medicine in RA, a *reachable goal in the not too distant future*.

CONCLUSION

In conclusion, we identified novel associations of genetic variants in *FPGS* and *ABCB1* genes with outcome in RA patients treated with MTX monotherapy.

FUTURE PERSPECTIVE

The findings obtained in this study may contribute to the delineation of new pharmacogenetic signatures suitable for the prediction of response and toxicity of methotrexate treatment.

EXECUTIVE SUMMARY

Background

- The identification of pharmacogenetic biomarkers will help to select the most adequate treatment for each patient and to improve therapy outcomes.

- Methotrexate is the first treatment option for rheumatoid arthritis.

Genotyping results

- The *FPGS* rs10106 variant was a predictor of response as measured by DAS28 difference at six months, MTX survival, and toxicity.
- Polymorphisms in the *ABCB1* gene were promising markers of toxicity in RA patients treated with MTX monotherapy.

REFERENCES

1. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 365(23), 2205-2219 (2011).
2. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis.* 69(6), 964–975 (2010).
3. Yazici Y. Long-term safety of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 28(Suppl 61), S65–7 (2010).
4. Combe B, Landewe R, Lukas C, Bolosiu HD, Breedveld F, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 66(1), 34–45 (2007).
5. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 59(6), 762–784 (2008).
6. Weinblatt ME, Kaplan H, Germain BF, Block S, Solomon SD, Merriman RC, et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis. A five-year prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 37(10), 1492–1498 (1994).
7. Kinder AJ, Hassell AB, Brand J, Brownfield A, Grove M, Shadforth MF. The treatment of inflammatory arthritis with methotrexate in clinical practice: treatment duration and incidence of adverse drug reactions. *Rheumatology (Oxford).* 44(1), 61–66 (2005).

8. Aletaha D, Smolen JS. The rheumatoid arthritis patient in the clinic: comparing more than 1,300 consecutive DMARD courses. *Rheumatology (Oxford)*. 41(12), 1367–1374 (2002).
9. Maetzel A, Wong A, Strand V, Tugwell P, Wells G, Bombardier C. Meta-analysis of treatment termination rates among rheumatoid arthritis patients receiving disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)*. 39(9), 975–981 (2000).
10. Albrecht K, Müller-Ladner U. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 28(Suppl 61), S95–101 (2010).
11. Alarcón GS. Early rheumatoid arthritis: combination therapy of doxycycline plus methotrexate versus methotrexate monotherapy. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2(6), 296–297 (2006).
12. Quan L-D, Thiele GM, Tian J, Wang D. The Development of Novel Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Expert Opin Ther Pat*. 18(7), 723–738 (2008).
13. Chan ESL, Cronstein BN. Mechanisms of action of methotrexate. *Bull Hosp Jt Dis*. 71 Suppl 1, S5–8 (2013).
14. Kremer JM. Methotrexate pharmacogenomics. *Ann Rheum Dis*. 65(9), 1121–1123 (2006).
15. Wessels J a M, Kooloos WM, De Jonge R, et al. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 54(9), 2830–2839 (2006).
16. Sharma S, Das M, Kumar A, et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 19(10), 823–828 (2009).
17. Wessels JAM, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YPM, Allaart CF, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum*. 54(4), 1087–1095 (2006).

18. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 69(9), 1580–1588 (2010).
19. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 38(1), 44–48 (1995).
20. Aletaha D, Smolen J. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 23(Suppl 39), S100–108 (2005).
21. Fransen J, Riel PLCM Van. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol*. 23(suppl.39), S93-99 (2005).
22. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res*. 22(9),1790–1797 (2012).
23. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 81(3), 559–575 (2007).
24. Wessels J a M, van der Kooij SM, le Cessie S, et al. A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 56(6), 1765–1775 (2007).
25. Van der Straaten RJHM, Wessels JAM, de Vries-Bouwstra JK, et al. Exploratory analysis of four polymorphisms in human GGH and FPGS genes and their effect in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 8(2), 141–150 (2007).
26. Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, et al. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Br J Clin Pharmacol*. 71(2), 237–243 (2011).
27. Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J*. 13(3), 227–234 (2013).

28. Davis LA, Polk B, Mann A, Wolff RK, Kerr GS, Reimold AM, et al. Folic acid pathway single nucleotide polymorphisms associated with methotrexate significant adverse events in United States veterans with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 32(3), 324–332 (2014).
29. Pawlik A, Wrzesniewska J, Fiedorowicz-Fabrycy I, Gawronska-Szklarz B. The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 42(9), 496–503 (2004).
30. Kato T, Hamada A, Mori S, Saito H. Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet*. 27(2), 192–199 (2012).
31. Drozdziak M, Rudas T, Pawlik A, et al. The effect of 3435C>T MDR1 gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with disease-modifying antirheumatic drugs. *Eur J Clin Pharmacol*. 62(11), 933–937 (2006).
32. Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, et al. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 24(5), 546–554 (2006).
33. Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol*. 64(11), 1057–1068 (2008).
34. Kooloos WM, Wessels JA, van der Straaten T, Allaart CF, Huizinga TW, Guchelaar H-J. Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 11(2), 163–175 (2010).
35. Stamp LK, Chapman PT, O'Donnell JL, et al. Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenet Genomics*. 20(6), 367–376 (2010).
36. Plaza-Plaza JC, Aguilera M, Cañadas-Garre M, et al. Pharmacogenetic polymorphisms contributing to toxicity induced by methotrexate in the southern Spanish population with rheumatoid arthritis. *OMICS*. 16(11), 589–595 (2012).

37. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, et al. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 35(4), 572–579 (2008).
38. Drozdik M, Rudas T, Pawlik A, Gornik W, Kurzawski M, Herczynska M. Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 7(6), 404–407 (2015).
39. Hayashi H, Tazoe Y, Tsuboi S, Horino M, Morishita M, Arai T, et al. A single nucleotide polymorphism of reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28(2), 164–168 (2013).
40. Samara SA, Irshaid YM, Mustafa KN. Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 52(9), 746–755 (2014).
41. Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, et al. Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 69(3), 377–383 (2013).

FIGURE

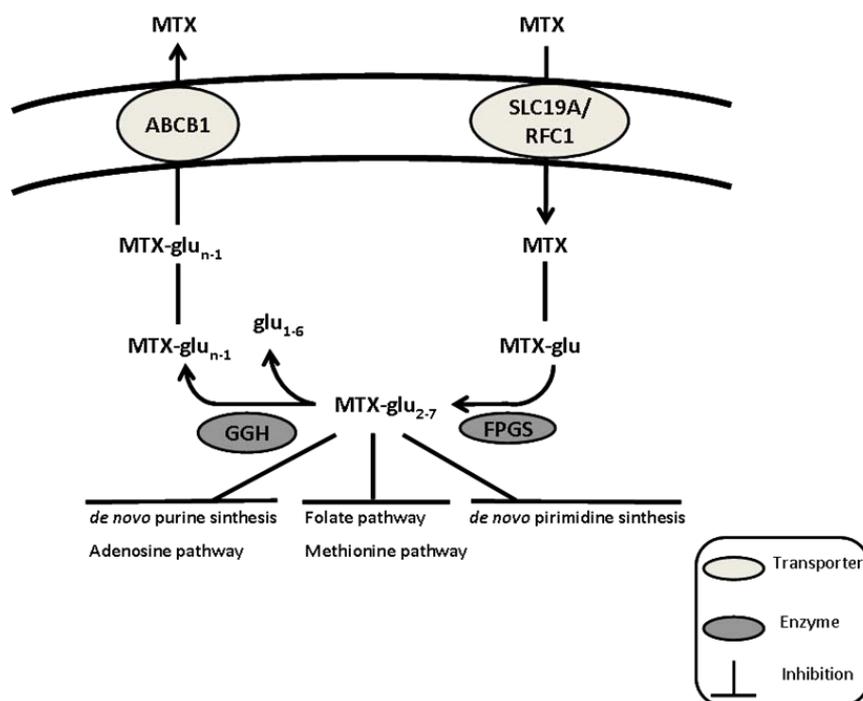


Figure 1. Scheme of pharmacokinetic genes involved in methotrexate pathway.

MTX: Methotrexate; MTXPGs: Methotrexate polyglutamates; SLC19A1/RFC1: Folate Transporter 1; ABCB1: ATP-Binding Cassette Sub-Family B Member 1; FPGS: Folypolyglutamate Synthase; GGH: Gamma-Glutamyl Hydrolase.

Adapted from the PharmGKB Methotrexate Pathways: (<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2039>) and (<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165816349>). Copyright to PharmGKB. Permission to adapt pathways has been given by PharmGKB and Stanford University.

Table 1. Definitions of adverse drug events (ADEs).

ADEs	Definition
Gastrointestinal complaints	Nausea, anorexia, vomiting, abdominal pain.
Hepatotoxicity	Alanine aminotransferase values < 3 times the upper limit of normal levels in absence of previous enzyme elevation, concomitant hepatotoxic drugs, positive viral hepatitis markers, alcohol consumption.
Alopecia	Loss of head hair.
Infections	Infections that required intravenous antibiotics
Lung disease	<u>Dyspnea</u> (with or without dry cough, fever and malaise) associated with a new interstitial pneumonitis at X-ray in absence of any demonstrable infectious <u>etiology</u> .
Leukopenia	Mild leukopenia: 4.0 - 2.0 x 10 ⁹ /l, moderate: 2.0 - 0.5 x10 ⁹ /l, and severe <0.5 x10 ⁹ /l.
Nodulosis	A local subcutaneous swelling or tissue lump in association with rheumatoid arthritis.
Mucosal ulcerations	Loss of the mucosal layer within the mouth.
Cancer of solid organ	Solid tumours that grow as a mass of cells in particular organ, tissue or gland.

Table 2. Characteristics of the SNPs analyzed.

Gene (location)	refSNP	Change	SNP location	MAF
SLC19A1 (21q22.3)	rs1051266*	G>A	Exon 2	0.43
	rs4818789	T>G	Intron 4	0.24
	rs2838957*	G>A	Intron 4	0.39
ABCB1 (7q21.1)	rs10267099	A>G	Intron 1	0.22
	rs13233308	C>T	Intron 1	0.46
	rs1858923	A>G	Intron 4	0.45
	rs17327624	G>T	Intron 4	0.22
	rs1202181	A>G	Intron 4	0.29
	rs1202184	A>G	Intron 5	0.50
	rs10280623	T>C	Intron 5	0.16
	rs10264990	T>C	Intron 5	0.37
	rs4148734	G>A	Intron 8	0.32
	rs1202170	C>T	Intron 8	0.48
	rs868755	G>T	Intron 9	0.40
	rs6961419	C>T	Intron 18	0.43
	rs11983225	T>C	Intron 21	0.12
	rs4437575	A>G	Intron 26	0.48
	rs1045642	A>G	Exon 27	0.48
rs3842*	T>C	Exon 29 (3'UTR)	0.13	
GGH (8q12.3)	rs1800909	A>G	Exon 1	0.28
	rs11545077	C>T	Exon 1	0.25
	rs13248452	G>A	Intron 2	0.32
	rs3780130	T>A	Intron 3	0.26
	rs7010484	T>C	Intron 5	0.26
	rs11995525	G>A	Intron 7	0.27
FPGS (9q34.11)	rs10987742	G>A	Intron 1	0.15
	rs10760502	G>A	Exon 1	0.41
	rs10106	T>C	Exon 15 (3'UTR)	0.44

MAF: minor allele frequency in this cohort.

*significant deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium]

Table 3. Clinical characteristics.

Characteristic	Values
Women, n (%)	138 (71.1)
Age at diagnosis, mean (S.D.), years	51.6 (13.4)
Disease duration, mean (S.D.), months	65.3 (117.0)
DAS28 baseline, mean (S.D.)	5.05 (1.32)
SDAI baseline, mean (S.D.)	23.83 (13.89)
CDAI baseline, mean (S.D.)	21.72 (12.45)
Number of previous DMARD, n (%)	
0	96 (49.5)
1	46 (23.7)
=>2	36 (18.6)
RF positive, n (%)	142 (73.2)
Anti-CCP positive, n (%)	130 (67.0)
Adverse effects, n (%)	83 (42.8)
Gastrointestinal complaints	30 (15.5)
Hepatotoxicity	27 (13.9)
Alopecia	10 (5.1)
Infections	9 (4.6)
Lung disease	8 (4.1)
Moderate-severe Leukopenia	6 (3.1)
Nodulosis	3 (1.5)
Mucosal ulcerations	2 (1.0)
Mild Leukopenia	2 (1.0)
Cancer of solid organ	2 (1.0)

S.D.: Standard deviation; DMARD: Disease-modifying antirheumatic drug; RF: Rheumatoid factor; CCP: Cyclic citrullinated peptides.

Table 4. Univariate analyses of SNPs and their association with response (DAS28 difference at 6 months) and MTX monotherapy survival.

Gene	refSNP	Genotype	Response		MTX survival	
			mean (\pm SD)	p ^a	mean (95% CI)	p ^b
<i>SLC19A1</i>	rs1051266	GG	-1.34 (\pm 1.26)	0.602	108 (77.0-138.7)	0.496
		GA	-1.91 (\pm 1.51)		108 (87.9-128.7)	
	rs4818789	AA	-1.38 (\pm 1.53)	0.183	90 (16.9-56.6)	0.824
		TT	-1.43 (\pm 1.39)		108 (84.2-131.3)	
		TG	-1.93 (\pm 1.53)		100 (80.4-120.4)	
		GG	-1.66 (\pm 0.98)		131 (75.5-186.5)	
rs2838957	GG	-1.33 (\pm 1.27)	0.261	114 (83.5-144.0)	0.678	
	GA	-1.81 (\pm 1.45)		102 (83.2-120.8)		
	AA	-1.78 (\pm 2.03)		102 (53.1-150.9)		
<i>ABCB1</i>	rs10267099	AA	-1.55 (\pm 1.45)	0.348	99 (81.8-116.6)	0.514
		AG	-1.85 (\pm 1.48)		118 (88.0-148.2)	
	rs13233308	GG	-2.03 (\pm 1.61)	0.560	94 (41.5-146.1)	0.295
		CC	-1.71 (\pm 1.22)		91 (64.7-117.5)	
		CT	-1.77 (\pm 1.73)		111 (89.1-133.3)	
	rs1858923	TT	-1.45 (\pm 1.18)	0.354	108 (77.2-139.1)	0.221
		AA	-1.47 (\pm 1.43)		89 (65.1-112.2)	
		AG	-1.65 (\pm 1.48)		114 (91.4-136.1)	
	rs17327624	GG	-1.90 (\pm 1.46)	0.843	112 (74.5-149.1)	0.708
		GT	-1.54 (\pm 1.29)		106 (81.4-130.2)	
		TT	-1.95 (\pm 1.50)		80 (23.2-137.1)	
	rs1202181	AA	-1.65 (\pm 1.48)	0.965	106 (85.2-126.6)	0.845
		AG	-1.66 (\pm 1.26)		105 (80.1-130.2)	
		GG	-1.68 (\pm 2.09)		101 (51.2-151.0)	
	rs1202184	AA	-1.47 (\pm 1.57)	0.416	88 (61.3-114.2)	0.284
		AG	-1.65 (\pm 1.41)		113 (91.4-134.4)	
		GG	-1.86 (\pm 1.48)		107 (72.9-141.6)	
	rs10280623	TT	-1.75 (\pm 1.45)	0.148	109 (90.5-128.3)	0.670
		TC	-1.59 (\pm 1.47)		95 (70.2-120.5)	
		CC	-0.23 (\pm 0.66)		93 (38.9-146.3)	
	rs10264990	TT-TC	-1.69 (\pm 1.48)	0.693	110 (93.5-125.9)	0.026
		CC	-1.50 (\pm 1.31)		63 (38.8-87.4)	
	rs4148734	GG	-1.56 (\pm 1.30)	0.712	98 (76.4-120.7)	0.262
		GA	-1.76 (\pm 1.65)		119 (94.9-143.1)	
AA		-1.61 (\pm 1.24)	89 (47.3-131.2)			
rs1202170	CC	-1.71 (\pm 1.48)	0.540	91 (65.0-117.9)	0.305	
	CT	-1.75 (\pm 1.60)		114 (92.8-135.9)		
	TT	-1.42 (\pm 1.13)		100 (66.3-134.1)		
rs868755	GG	-1.42 (\pm 1.40)	0.264	85 (64.8-104.6)	0.023	
	GT-TT	-1.81 (\pm 1.49)		118 (96.8-138.2)		
rs6961419	CC	-1.40 (\pm 1.30)	0.870	116 (86.2-145.9)	0.230	
	CT	-1.90 (\pm 1.55)		109 (87.6-130.6)		
	TT	-1.37 (\pm 1.34)		77 (52.2-102.1)		
rs11983225	TT	-1.71 (\pm 1.44)	0.707	105 (87.7-122.8)	0.863	
	TC	-1.25 (\pm 1.32)		102 (70.7-134.0)		
	CC	-1.94 (\pm 2.44)		106 (49.5-162.5)		
rs4437575	AA	-2.00 (\pm 1.22)	0.189	113 (79.2-146.8)	0.722	
	AG	-1.53 (\pm 1.49)		105 (84.7-124.9)		
	GG	-1.43 (\pm 1.65)		96 (68.6-123.4)		
rs1045642	AA	-1.27 (\pm 1.59)	0.124	81 (61.0-100.6)	0.125	
	AG	-1.76 (\pm 1.45)		113 (91.3-133.8)		
	GG	-1.93 (\pm 1.26)		116 (79.6-153.0)		
rs3842	TT	-1.66 (\pm 1.46)	0.818	108 (90.0-126.5)	0.058	
	TC	-1.79 (\pm 1.41)		107 (75.5-138.7)		
	CC	-1.08 (\pm 1.83)		33 (17.9-47.5)		
<i>GGH</i>	rs1800909	AA	-1.65 (\pm 1.61)	0.567	94 (73.4-114.2)	0.182
		AG	-1.81 (\pm 1.30)		117 (91.9-142.7)	

		GG	-0.70 (\pm 1.01)		118 (73.7-161.5)	
	rs11545077	CC	-1.70 (\pm 1.59)	0.587	94 (73.6-114.0)	0.125
		CT	-1.69 (\pm 1.31)		116 (91.0-140.5)	
		TT	-0.83 (\pm 1.40)		134 (81.8-186.6)	
	rs13248452	GG	-1.76 (\pm 1.50)	0.552	99 (78.4-118.7)	0.677
		GA	-1.63 (\pm 1.45)		107 (83.6-129.6)	
		AA	-1.45 (\pm 1.41)		124 (65.9-181.8)	
	rs3780130	TT	-1.59 (\pm 1.54)	0.987	107 (83.4-129.7)	0.519
		TA	-1.86 (\pm 1.36)		108 (87.8-128.6)	
		AA	-0.96 (\pm 1.17)		70 (24.4-115.2)	
	rs7010484	TT	-1.68 (\pm 1.60)	0.854	102 (82.0-122.3)	0.758
		TC	-1.55 (\pm 1.27)		109 (84.6-134.0)	
		CC	-2.43 (\pm 1.13)		96 (46.0-145.3)	
	rs11995525	GG	-1.51 (\pm 1.24)	0.898	115 (92.4-137.4)	0.263
		GA	-2.02 (\pm 1.59)		92.4 (72.5-112.4)	
		AA	-0.66 (\pm 1.72)		108 (63.7-151.8)	
<i>FPGS</i>	rs10987742	GG	-1.52 (\pm 1.37)	0.033	100 (84.1-116.7)	0.672
		GA	-1.72 (\pm 1.35)		121(86.1-155.7)	
		AA	-4.84 (\pm 1.64)		92.4 (92.4-92.4)	
	rs10760502	GG	-1.64 (\pm 1.55)	0.620	88 (63.9-111.9)	0.064*
		GA	-1.57 (\pm 1.47)		107 (86.1-128.1)	
		AA	-2.01 (\pm 1.17)		142(93.9-189.2)	
	rs10106	TT	-2.12 (\pm 1.56)	0.041	144 (108.8-178.9)	0.005*
		TC	-1.59 (\pm 1.49)		94 (76.5-112.1)	
		CC	-1.15 (\pm 0.97)		77 (50.6-103.6)	

*association statistically significant in the multivariate analyses.

^a Based on linear regression analyses ^b Based on log-rank test

Table 5. Haplotypes significantly associated with response and toxicity.

Phenotype	Gene	Haplotype	p	SNPs
Response	<i>FPGS</i>	AGT ^c	0.017	rs10987742 rs10760502 rs10106
Toxicity	<i>ABCB1</i>	ATAGGACTGCGCCGAT ^d	0.017	rs10267099 rs13233308 rs1858923 rs17327624 rs1202181 rs1202184 rs10280623 rs10264990 rs148734 rs1202170 rs868755 rs6961419 rs11983225 rs4437575 rs1045642 rs3842
	<i>FPGS</i>	GGC ^d	0.032	rs10987742 rs10760502 rs10106

^c beta=-0.7579; R²=0.07422

^d *ABCB1* haplotype: chi-square=5.7 and OR=undefined ; *FPGS* haplotype: chi-square=4.89 and OR=0.61

Table 6. Univariate analyses of SNPs and their association with toxicity.

Gene	refSNP	Genotype	Toxicity Yes n(%) / No n (%)	OR (95% CI)	p ^e
<i>SLC19A1</i>	rs1051266	GG	23 (41.1)/33 (58.9)	Ref.	0.619
		GA	50 (45.5)/60 (54.5)	1.20 (0.62-2.29)	
		AA	10 (35.7)/18 (64.3)	0.80 (0.31-2.04)	
	rs4818789	TT	45 (42.5)/61 (57.5)	Ref.	0.549
		TG	36 (45.0)/44 (55.0)	1.11 (0.62-1.99)	
		GG	2 (25.0)/6 (75.0)	0.45 (0.09-2.34)	
	rs2838957	GG	27 (45.0)/33 (55.0)	Ref.	0.853
		GA	46 (41.1)/66 (58.9)	0.85 (0.45-1.60)	
		AA	10 (45.5)/12 (54.5)	1.02 (0.38-2.72)	
<i>ABCB1</i>	rs10267099	AA	47 (39.8)/71 (60.2)	Ref.	0.575
		AG	31 (47.0)/35 (53.0)	1.34 (0.73-2.46)	
		GG	5 (50.0)/5 (50.0)	1.51 (0.41-5.01)	
	rs13233308	CC	22 (37.3)/37 (62.7)	Ref.	0.444
		CT	40 (43.0)/53 (57.0)	1.27 (0.65-2.48)	
		TT	21 (50.0)/21 (50.0)	1.68 (0.75-3.75)	
	rs1858923	AA	18 (31.0)/40 (69.0)	Ref.	0.031
		AG-G/G	65 (47.8)/71 (52.2)	2.03 (1.06-3.90)	
	rs17327624	GG	53 (45.7)/63 (54.3)	Ref.	0.564
		GT	26 (37.7)/43 (62.3)	0.72 (0.39-1.32)	
		TT	4 (44.4)/5 (55.6)	0.84 (0.24-3.72)	
	rs1202181	AA	47 (46.1)/55 (53.9)	Ref.	0.515
		AG	29 (40.8)/ 42 (59.2)	0.81 (0.44-1.49)	
		GG	7 (33.3)/14 (66.7)	0.59 (0.22-1.57)	
	rs1202184	AA	16 (34.8)/30 (65.2)	Ref.	0.112
		AG	42 (40.8)/61 (59.2)	1.29 (0.63-2.66)	
		GG	25 (55.6)/20 (44.4)	2.34 (1.01-5.46)	
	rs10280623	TT	66 (47.1)/74 (52.9)	1.94 (1.00- 3.77)	0.048*
		TC-CC	17 (31.5)/37 (68.5)	Ref.	
	rs10264990	TT	32 (43.2)/42 (56.8)	Ref.	0.956
		TC	41 (43.2)/ 54 (56.8)	1.00 (0.54-1.84)	
		CC	10 (40.0)/15 (60.0)	0.88 (0.35-2.20)	
	rs4148734	GG	37 (42.0)/51 (58.0)	Ref.	0.912
		GA	37 (42.5)/ 50 (57.5)	1.02 (0.56-1.86)	
		AA	9 (47.4)/10 (52.6)	1.24 (0.46-3.36)	
	rs1202170	CC	19 (38.8)/30 (61.2)	Ref.	0.436
		CT	42 (41.2)/60 (58.8)	1.11 (0.55-2.22)	
		TT	22 (51.2)/21 (48.8)	1.65 (0.72-3.79)	
	rs868755	GG	25 (36.8)/43 (63.2)	Ref.	0.025*
		GT	39 (40.2)/58 (59.8)	3.27 (0.61- 2.19)	
		TT	19 (65.5)/10 (34.5)	0.58 (1.32- 8.12)	
	rs6961419	CC	31 (50.8)/30 (49.2)	Ref.	0.202
		CT	36 (36.7)/62 (63.3)	0.56 (0.29-1.08)	
		TT	16 (45.7)/19 (54.3)	0.82 (0.35-1.88)	
	rs11983225	TT	69 (45.4)/83 (54.6)	Ref.	0.376
		TC	12 (33.3)/24 (66.7)	0.60 (0.28-1.29)	
		CC	2 (33.3)/4 (66.7)	0.60 (0.11-3.38)	

	rs4437575	AA	24 (46.2)/28 (53.8)	Ref.	0.759
		AG	42 (42.9)/56 (57.1)	0.88 (0.45-1.72)	
		GG	17 (38.6)/27 (61.4)	0.74 (0.33-1.66)	
	rs1045642	AA	20 (37.0)/34 (63.0)	Ref.	0.603
		AG	42 (45.2)/51 (54.8)	1.40 (0.70-2.78)	
		GG	21 (44.7)/26 (55.3)	1.37 (0.62-3.05)	
	rs3842	TT	66 (43.7)/85 (56.3)	Ref.	0.871
		TC	14 (38.9)/22 (61.1)	0.82 (0.39-1.72)	
		CC	3 (42.9)/4 (57.1)	0.97 (0.21-4.47)	
<i>GGH</i>	rs1800909	AA	37 (37.0)/63 (63.0)	Ref.	0.111
		AG	37 (46.3)/43 (53.8)	1.47 (0.81-2.67)	
		GG	9 (64.3)/5 (35.7)	3.07 (0.96-9.84)	
	rs11545077	CC	40 (37.7)/66 (62.3)	Ref.	0.223
		CT	37 (47.4)/41 (52.6)	1.49 (0.82-2.70)	
		TT	6 (60.0)/4 (40.0)	2.48 (0.66-9.31)	
	rs13248452	GG-GA	70 (40.0)/105 (60.0)	Ref.	0.017
		AA	13 (68.4)/6 (31.6)	3.25 (1.18-8.96)	
	rs3780130	TT	39 (36.4)/68 (63.6)	Ref.	0.097
		TA	36 (48.6)/38 (51.4)	1.65 (0.90-3.01)	
		AA	8 (61.5)/5 (38.5)	2.79 (0.85-9.12)	
	rs7010484	TT	51 (48.1)/55 (51.9)	Ref.	0.179
		TC	29 (38.2)/47 (61.8)	0.67 (0.37-1.21)	
		CC	3 (25.0)/9 (75.0)	0.36 (0.09-1.40)	
	rs11995525	GG	48 (46.2)/56 (53.8)	Ref.	0.594
		GA	30 (39.0)/47 (61.0)	0.75 (0.41- 1.36)	
		AA	5 (38.5)/ 8 (61.5)	0.73 (0.22- 2.38)	
<i>FPGS</i>	rs10987742	GG	59 (42.8)/79 (57.2)	Ref.	0.693
		GA	22 (41.5)/31 (58.5)	0.95 (0.50-1.81)	
		AA	2 (66.7)/1 (33.3)	2.68 (0.24-30.24)	
	rs10760502	GG	22 (34.4)/42 (65.6)	Ref.	0.118
		GA	44 (44.0)/ 56 (56.0)	1.50 (0.78-2.87)	
		AA	17 (56.7)/ 13 (43.3)	2.50 (1.03-6.06)	
	rs10106	TT	33 (55.0)/50 (37.3)	2.05 (1.11-3.81)	0.021*
		TC-CC	27 (45.0)/84 (62.7)	Ref.	

*association statistically significant in the multivariate analyses.

^eBased on Pearson chi-square two sided test

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

En los últimos años, se han propuesto diferentes marcadores de respuesta y toxicidad para identificar a los pacientes con artritis reumatoide que presentan un mejor resultado después del tratamiento con MTX. Es en este contexto donde el estudio farmacogenético de los pacientes con AR resulta de máximo interés con el fin de optimizar y personalizar la estrategia terapéutica.

A continuación se discuten los resultados derivados de los estudios farmacogenéticos desarrollados en la presente tesis.

4.1. ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS DE LA VÍA METABÓLICA DEL ÁCIDO FÓLICO QUE SON DIANA DEL MTX

Hemos seleccionado 27 polimorfismos localizados en los genes *DHFR*, *TYMS*, *MTHFR*, *ATIC* y *CCND1*, que participan en el mecanismo de acción del MTX (Anexo 2).

En base a las evidencias expuestas en la introducción de esta tesis realizamos un primer estudio (apartado 3.1 de los Resultados). Los resultados de este trabajo muestran una asociación entre dos SNPs en el gen *MTHFR*, rs17421511 y rs1476413, y uno en el gen *DHFR*, rs1643650, y la respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con artritis reumatoide. Asimismo, también se encontró que dos SNPs en el gen *ATIC*, rs16853826 y rs10197559, se asociaron con toxicidad en la misma cohorte de pacientes.

4.1.1. Metilentetrahidrofolato Reductasa (*MTHFR*)

Se han analizado diferentes SNPs de *MTHFR* con el fin de encontrar asociación entre ellos y la eficacia y toxicidad del MTX en pacientes con AR. De todos ellos, los SNPs rs1801133 (677C>T) y rs1801131 (A1298C) son de los que más trabajos publicados existen.

La variante *MTHFR* rs1801133 (677C>T) es un polimorfismo no sinónimo que origina la sustitución de alanina por valina en el codón 222 de la enzima *MTHFR*. Este cambio de aminoácido produce una forma termolábil de *MTHFR*, disminuye su actividad y produce una elevación secundaria de los niveles de homocisteína en plasma (Kang et al. 1988). Diversos estudios han evaluado el papel del polimorfismo rs1801133 en relación a la eficacia y toxicidad del MTX en pacientes con AR (Tabla 8) la mayoría sin hallar significación estadística o con resultados no congruentes.

En concreto tres estudios describen resultados estadísticamente significativos entre rs1801133 y eficacia, dos de ellos asocian el alelo T de rs1801133 a una menor eficacia del MTX en pacientes con AR (Dervieux, Greenstein, and Kremer 2006; Wessels et al. 2006) y el tercero en cambio, asocia el alelo T a una mayor eficacia en una cohorte de Polonia (Kurzawski et al. 2007).

Al evaluar la asociación entre rs1801133 y toxicidad, los resultados de los estudios publicados son homogéneos y describen una mayor toxicidad del MTX en los individuos portadores del alelo T (Urano et al. 2002; Taniguchi et al. 2007; Kim et al. 2006; Xiao et al. 2009; Cáliz et al. 2012; Plaza-Plaza et al. 2012; Ranganathan et al. 2008; Weisman et al. 2006; van Ede et al. 2001).

MTHFR rs 1801133 (677 C>T)							
Autor	Año	Población	n	Eficacia	Res. de Eficacia	Toxicidad	Res. de toxicidad
Van Ede	2001	Holanda	236	NS	-	S	T ↑toxicidad
Urano	2002	Japón	106	NS	-	S	T ↑toxicidad
Berkun	2004	Israel	93	NS	-	NS	-
Hughes	2006	EEUU	223	NS	-	NS	-
Weisman	2006	EEUU	214	NE		S	T ↑toxicidad
Dervieux	2006	EEUU	48	S	T ↓ eficacia	NS	-
Wessels	2006	Holanda	205	S	C ↑ eficacia	NS	-
Kim	2006	Corea	385	NE		S	T ↑toxicidad
Aggarwal	2006	India	150	NS	-	NS	-
Kurzawski	2007	Polonia	174	S	T ↑ eficacia	NE	
Taniguchi	2007	Japón	208	NS	-	S	T ↑toxicidad
Ranganathan	2008	EEUU	127	NE		S	T ↑toxicidad
Bohanec	2008	Eslovenia	213	NS	-	NS	-
Ghodke	2008	India	34	NS	-	NS	-
Inoue	2009	Japón	36	NS	-	NE	
Lee	2009	EEUU	262	NS	-	NE	
Taraborelli	2009	Italia	84	NS	-	NS	-
Urano	2009	Japón	731	NE		NS	-
Hayashi	2009	Japón	87	NS	-	NE	
Xiao	2010	China	110	NS	-	S	T ↑toxicidad
Stamp	2010	Nueva Zelanda	200	NS	-	NS	-
Owen	2013	Reino Unido	309	NS		NS	-
Kumagai	2011	Japón	167	NS	-	NS	-
Taşbaş	2011	Turquia	64	NS	-	NS	-
Mena	2011	Méjico	70	NE		NS	-
Cáliz R	2012	España	468	NE		S	T ↑toxicidad
Choe JY	2012	Corea	167	NE		NS	-
Plaza-plaza	2012	España	174	NS	-	S	T ↑toxicidad

↓: Menor, ↑:Mayor, NS: No significativo, S:Significativo, NE:No evaluado

Tabla 8. Revisión de los estudios publicados de rs1801133 localizado en el gen *MTHFR* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

La variante rs1801131 (1298A>C) del gen MTHFR es también un polimorfismo no sinónimo que origina la sustitución de glutamina por alanina en el dominio C-terminal de la enzima MTHFR, lo que produce la disminución de la actividad de la enzima (van der Put et al. 1998). En las últimas dos décadas se han publicado diferentes trabajos que estudian la posible relación entre el polimorfismo rs1801131 y la eficacia y/o toxicidad del MTX con resultados dispares (Tabla 9).

MTHFR rs 1801131 (1298 A>C)							
Autor	Año	Población	n	Eficacia	Res. de Eficacia	Toxicidad	Res. de toxicidad
Urano	2002	Japón	106	S	C ↑ eficacia	NS	-
Berkun	2004	Israel	93	NS	-	S	C ↓ toxicidad
Wessels	2006	Países Bajos	205	S	A ↑ eficacia	S	C ↑ toxicidad
Dervieux	2006	USA	48	NS	-	S	C ↑ toxicidad
Hughes	2006	USA	223	NS	-	S	A ↑ toxicidad
Taniguchi	2007	Japón	208	NS	-	NS	-
Kurzawski	2007	Polonia	174	S	C ↑ eficacia	NE	
Bohanec	2008	Eslovenia	213	NS	-	S	C ↓ toxicidad
Ghodke	2008	India	34	NS	-	NS	-
Taraborelli	2009	Italia	84	NS	-	NS	-
Urano	2009	Japón	731	NE		NS	-
Stamp	2010	Nueva Zelanda	200	NS	-	NS	-
Xiao	2010	China	110	S	C ↑ eficacia.	NS	-
Taşbaş	2011	Turquía	64	NS	-	NS	-
Mena	2011	Méjico	70	NE		S	C ↑ toxicidad
Owen	2011	Reino Unido	309	NS	-	NS	-
Kumagai	2011	Japón	167	NS	-	NS	-
Choe JY	2012	Corea	167	NE		S	C ↑ toxicidad
Cáliz R	2012	España	468	NE		NS	-
Plaza-plaza	2012	España	174	NS	-	NS	-
Kato	2012	Japón	55	S	A ↑ eficacia	NE	

↓: Menor, ↑: Mayor, NS: No significativo, S: Significativo, NE: No evaluado

Tabla 9. Revisión de los estudios publicados de rs1801131 localizado en el gen MTHFR relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

Referente a la eficacia, tres grupos describen que los portadores del alelo C en rs1801131 presentaban una mejor respuesta al fármaco (Kurzawski et al. 2007; Urano et al. 2002; Xiao et al. 2009), sin embargo, los grupos de Kato *et al.* y Wessels *et al.* asociaron una mayor eficacia del fármaco al alelo A (Wessels et al. 2006; Kato et al. 2012).

En relación a la toxicidad, diferentes estudios publicados también mostraron una asociación significativa pero, de nuevo, con resultados contradictorios. En las cohortes de Eslovenia, Israel y de EEUU los portadores del alelo C presentan una menor toxicidad al MTX (efecto protector) (Bohanec Grabar et al. 2008; Berkun et al. 2004; Hughes et al. 2006). En cambio, en las

cohortes de Holanda, Méjico, Corea y EEUU, el alelo C se asoció a una mayor toxicidad (Wessels et al. 2006; Mena et al. 2011).

A pesar de los estudios descritos dónde se encuentra una significación entre el polimorfismo rs1801131 de *MTHFR* y la eficacia y/o toxicidad al fármaco, se han publicados muchos otros estudios en los que no encuentran dicha asociación con la eficacia (Berkun et al. 2004; Dervieux, Greenstein, and Kremer 2006; Hughes et al. 2006; Taniguchi et al. 2007; Bohanec Grabar et al. 2008; Taraborelli et al. 2009; Stamp et al. 2010; Taşbaş et al. 2011; S. a Owen et al. 2013; Plaza-Plaza et al. 2012; Ghodke et al. 2008; Kumagai et al. 2003) ni con la toxicidad del MTX (Urano et al. 2002; Taniguchi et al. 2007; Taraborelli et al. 2009; Stamp et al. 2010; Xiao et al. 2009; Taşbaş et al. 2011; S. A. Owen et al. 2013; Cáliz et al. 2012; Plaza-Plaza et al. 2012; Ghodke et al. 2008; Kumagai et al. 2003).

En concordancia con estos trabajos en nuestro estudio tampoco hemos encontrado una asociación significativa entre los polimorfismos rs1801133 y rs1801131 del gen *MTHFR* y la respuesta o toxicidad al MTX en pacientes con AR. Esta falta de concordancia entre los resultados puede ser debida a diferentes factores. Las variables clínicas escogidas para evaluar la actividad de la enfermedad y la toxicidad difieren entre los estudios. Por otro lado, la frecuencia del alelo minoritario en ambos SNPs difiere entre etnias, sin tener las mismas posibilidades de encontrar asociaciones estadísticamente significativas en poblaciones asiáticas que en caucásicas. Esta valoración queda reflejada en el estudio de otro polimorfismo de *MHFR*, rs4846051. Hughes *et al.* estudiaron la asociación entre eficacia y toxicidad del MTX y rs4846051 en poblaciones de origen caucásico y afroamericano. Los resultados mostraron una mayor toxicidad del fármaco en pacientes afroamericanos portadores del alelo G. Este resultado no se reprodujo en la población caucásica (Hughes et al. 2006).

Entre todos los polimorfismos estudiados en el presente trabajo, hemos hallado una asociación estadísticamente significativa entre los SNPs rs17421511 y rs1476413 y la respuesta al tratamiento con MTX en monoterapia. Ambos polimorfismos se encuentran en zonas intrónicas del gen. Se ha descrito que mutaciones en un solo nucleótido en secuencias localizadas en intrones pueden modular el reconocimiento de los sitios de *splicing* y modificar el proceso de traducción en caso de afectar a regiones reguladoras (Cooper, Wan, and Dreyfuss 2009; Faustino and Cooper 2003). Estas secuencias se conocen como "*enhancers*" o "*silencers*" y son reconocidas por complejos de proteínas que frecuentemente están implicados en la regulación del *splicing* alternativo.

Tal y como hemos descrito previamente, son muchos los estudios que intentan asociar polimorfismos de MTHFR con la presencia de eficacia y/o toxicidad del MTX en pacientes con AR. La falta de homogeneidad en la definición de las variables escogidas, el pequeño tamaño muestral y las diversas etnias estudiadas podrían ser algunos de los motivos de las discrepancias de los resultados. A pesar de ello, varios estudios coinciden al relacionar MTHFR rs1801133 y rs1801131 de MTHFR con la toxicidad del MTX, lo que podría traducir la importancia del gen en la vía metabólica del MTX.

4.1.2. Dihidrofolato Reductasa (DHFR)

El gen de la DHFR ha sido poco estudiado en la AR (Tabla 10). Milic *et al.* (Milic *et al.* 2015) en una cohorte de 125 pacientes analizaron los polimorfismos rs408626 y rs6151599 y describieron una menor eficacia del MTX en pacientes portadores del alelo A del SNP rs408626. Referente a la toxicidad, Owen *et al.* en una muestra de 309 pacientes estudiaron las variantes rs12517451, rs10072026 y rs1643657 del gen. Describieron una asociación significativa entre los polimorfismos estudiados y la presencia de efectos adversos (S. a Owen *et al.* 2013).

En nuestro estudio, analizamos la variante rs408626, aunque no encontramos la asociación descrita por Milic con la eficacia del MTX. Sin embargo, sí encontramos una asociación entre el SNP rs1643650 y la respuesta al fármaco: los pacientes con un genotipo T/C o C/C presentaron una mejor respuesta al MTX en monoterapia que los pacientes con genotipo T/T. La variante rs1643650 se encuentra en una zona intrónica del gen. Se trata de una variante genética no estudiada previamente, por lo que no se ha descrito ninguna asociación con eficacia y toxicidad al MTX. Del mismo modo que sucede con los polimorfismos descritos en MTHFR, a pesar de no conocer la funcionalidad de rs1643650, la modificación en la secuencia de un aminoácido en una región intrónica, podría modular el reconocimiento de los sitios de *splicing* al modificar el proceso de transcripción del gen.

4.1.3. 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótidoformil transferasa (ATIC)

ATIC está implicada en la liberación extracelular de adenosina, y desempeña un papel fundamental en los efectos anti-inflamatorios del MTX a dosis bajas (B N Cronstein, Naime, and Ostad 1993). Diferentes variantes genéticas de *ATIC* han sido estudiadas con el fin de encontrar asociación entre ellas y la toxicidad y/o eficacia del tratamiento con MTX en pacientes con AR (Tabla 11).

DFHR								
SNP	Referencia	Año	Población	n	Eficacia	Res. de Eficacia	Toxicidad	Res. de toxicidad
rs408626 317 A>G	Milic et al.,	2012	Serbia	125	S	A ↓ eficacia	NS	-
rs6151599 216T>C	Milic et al.,	2012	Serbia	125	NS	-	NS	-
rs12517451 30514432 C>T	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	NS	-	S	TT↑ toxicidad
rs10072026 3053499 T>C	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	NS	-	S	TT↓ toxicidad
rs1643657 19384A>G	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	NS	-	S	AA↓toxicidad

↓: Menor, ↑:Mayor, NS: No significativo, S:Significativo

Tabla 10. Revisión de los estudios publicados del gen DHFR relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

El polimorfismo rs2372536 del gen ATIC es el que ha sido más estudiado hasta el momento. Los equipos de Wessels y Dervieux (Wessels et al. 2006; Dervieux et al. 2004) describieron un aumento de eficacia del MTX en aquellos pacientes portadores del alelo C, sin embargo, otros investigadores no han podido reproducir estos resultados relacionados con la eficacia (Yanagimachi et al. 2011; Kato et al. 2012; Grabar et al. 2010; Stamp et al. 2010; Sharma et al. 2009; Takatori et al. 2015; Dervieux, Greenstein, and Kremer 2006).

En relación a la toxicidad, se ha descrito que los portadores del alelo G en el mismo SNP (rs2372536), presentan una mayor toxicidad a MTX (Dervieux, Greenstein, and Kremer 2006; Wessels et al. 2006; Weisman et al. 2006; Bohanec Grabar et al. 2008). Del mismo modo que sucede en el estudio de la eficacia, otros autores no han encontrado esta relación entre rs2372536 y la presencia de toxicidad en pacientes con AR expuestos a MTX. Los resultados de nuestro estudio, tampoco encuentran asociación estadísticamente significativa entre dicho polimorfismo y la eficacia y/o toxicidad al MTX.

El estudio del polimorfismo rs673993, en cambio, presenta resultados concordantes entre los diferentes grupos. Dos estudios independientes realizados por Lannaccone *et al.* y Lee *et al.*, relacionan el alelo C con una mayor respuesta a MTX (Y. C. Lee et al. 2009; Lannaccone et al. 2011).

Por otro lado, nuestro grupo, encuentra una asociación y una tendencia a la significación estadística en rs16853826 y rs10197559 respectivamente, y la toxicidad del fármaco. Ambos polimorfismos están localizados en regiones intrónicas del gen. Aunque la función biológica de estos SNPs no se ha determinado, el software Alamut predice que los SNPs en el gen ATIC podrían modificar lugares de reconocimiento del proceso de *splicing* del gen.

ATIC								
SNP	Referencia	Año	Población	n	Eficacia	Res. de Eficacia	Toxicidad	Res. de toxicidad
rs2372536 347C>G	Dervieux et al.,	2004	USA	108	S	GG ↓eficacia	NE	
	Dervieux et al.,	2006	USA	48	NS	-	S	G ↑toxicidad
	Weisman et al.,	2006	USA	214	NE		S	G ↑toxicidad
	Wessels et al.,	2006	Países Bajos	205	S	C ↑ eficacia	S	G ↑ toxicidad
	Takator et al.,	2006	Japón	124	NS	-	NS	-
	Sharma et al.,	2009	India	281	NS	-	NE	
	Stamo et al.,	2010	Nueva Zelanda	200	NS	-	NS	-
	Grabar et al.,	2010	Eslovenia	211	NS	-	S	G ↑toxicidad
	Kato et al.,	2012	Japón	55	NS	-	NE	
Yanagimachi et al.,	2011	Japon	92	NS	-	NS		
rs4673993 40661T>C	Iannaccone et al.,	2011	USA	120	S	C ↑ eficacia	NE	
	Lee et al.,	2009	USA	120	S	C ↑ eficacia	NE	
rs12995526 26293T>C	Owen et al.,	2013	Reino unido	309	S	C ↑ eficacia	NS	-
rs4535042 129T>G	Milic et al.,	2012	Serbia	125	NS	-	NS	-
rs3821353 26101G>T	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	G ↑ eficacia	NS	-
rs7563206 18976C>T	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	C ↑ eficacia	NS	-
rs16853834 38558C>T	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	C ↑ eficacia	NS	-

↓: Menor, ↑: Mayor, NS: No significativo, S: Significativo, NE: No evaluado

Tabla 11. Revisión de los estudios publicados del gen ATIC relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

4.1.4. Timidilato Sintetasa (TS)

La TS es inhibida directamente por el MTXPG, por lo que se han intentado relacionar algunas de sus variaciones genéticas con la respuesta y /o toxicidad del MTX en pacientes con AR.

Se ha descrito una asociación entre una secuencia variable de repeticiones en tándem en la región promotora y los niveles de expresión proteica. Recientemente, un estudio ha descrito que el genotipo 3G/3G en el alelo TS*3 se asocia con peor respuesta al MTX en pacientes con AR (Jekic et al. 2013).

Las publicaciones sobre el estudio de TS son escasas y con criterios no homogéneos. Por ejemplo, James *et al.* estudiaron el polimorfismo rs34489327 y encontraron una asociación estadísticamente significativa con mayor eficacia del MTX en pacientes con AR. Una limitación importante de este estudio es que la población estaba bajo tratamiento combinado de FMEs y no en monoterapia con MTX (James et al. 2008). Dervieux et al también describieron una asociación entre las repeticiones en tándem de la región promotora de TS y la eficacia al MTX en pacientes con AR (Dervieux et al. 2004). Diseñaron un índice farmacogenético que se

calculaba a partir de la suma de las variantes homocigotas de diferentes genes: RFC-1 AA + ATIC 347GG + TS *2/*2 con el fin de relacionar este modelo combinado con la eficacia y/o toxicidad del MTX. Los resultados del estudio muestran que los pacientes portadores de una variante del genotipo homocigoto eran más propensos a tener una buena respuesta al MTX. Los resultados de nuestro estudio no reproducen esta asociación. Nosotros evaluamos TS de forma independiente, sin realizar un modelo farmacogenético que tenga en cuenta TS asociado a SNPs de otros genes, motivo por el cual nuestros resultados no son comparables con los del estudio de Dervieux.

Asimismo, tampoco encontramos asociación entre la eficacia y/o toxicidad del MTX con el resto de polimorfismos estudiados (rs183205964, rs2847153, rs2847150, rs2847149, rs16948305). Por lo que podemos concluir que en nuestra población de pacientes con AR tratados en monoterapia con MTX la TS no es un marcador farmacogenético.

4.1.5. Ciclina D1 (*CCND1*)

La *CCND1* es un gen candidato a ser estudiado ya que la proteína para la que codifica está relacionada de forma indirecta con los niveles de TS y, consecuentemente, puede modificar los niveles de MTXPG intracelulares.

Se ha reportado una disminución de efectos adversos en pacientes portadores del genotipo AA en población con Leucemia linfoblástica aguda de precursores T en tratamiento con dosis altas de MTX (Costea et al. 2006).

A pesar de estos resultados, no existen publicaciones previas que estudien su relación con la eficacia y toxicidad del MTX en pacientes con AR. Nuestros resultados no muestran asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos estudiados (rs9344, rs649392) y la presencia de efectos adversos o la mayor eficacia en pacientes con AR bajo tratamiento con MTX. Esta discordancia entre la toxicidad descrita entre pacientes con Leucemia linfoblástica aguda infantil y Artritis reumatoide, podría deberse a las diferentes dosis de fármaco administradas en cada patología, lo que podría explicarse mediante la hipótesis de que la regulación de la ciclina es dosis dependiente.

4.2. ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS DE LOS GENES IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE CELULAR DEL MTX Y EN SU POLIPLUTAMACIÓN

Hemos seleccionado 34 polimorfismos localizados en los genes SLC19A1 / RFC1, ABCB1, FPGS y GGH, que participan en el transporte celular del MTX y en su activación e inactivación través de la poliplutamación (Anexo 2).

El estudio de los mencionados genes candidatos nos permitió la publicación de un segundo trabajo (apartado 3.2 de los Resultados). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una asociación entre dos SNPs en el gen *FPGS*, rs10987742 y rs10106, y la respuesta al tratamiento con MTX. El SNP rs10106 también estaba asociado con la presencia de eventos adversos y el tiempo de supervivencia del fármaco. Los resultados también muestran que tres SNPs en el gen ABCB1, rs868755, rs10280623 y rs1858923, estaban asociados con la toxicidad al MTX en la misma cohorte de pacientes. Y que dos de los SNPs estudiados, rs10264990 y rs868755, también se asociaron con el tiempo de supervivencia del MTX.

4.2.1. Transportador de folato reducido de proteína 1 (*RFC1/SLC19A1*)

El transportador RFC1/SLC19A1 interviene en la entrada del MTX a la célula, por lo que una alteración en su funcionalidad puede provocar un aumento o disminución de los niveles de MTX intracelular (Dixon, Lanpher, Chiu, Kelley, & Cowan, 1994; Matherly, Hou, & Deng, 2007; Prasad, Ramamoorthy, Leibach, & Ganapathy, 1995). Se han estudiado diferentes variantes genéticas, con el fin de valorar su posible papel como marcador farmacogenético en pacientes con AR tratados con MTX (Tabla 12).

De los polimorfismos descritos en SLC19A1, el más estudiado es rs1051266 (G80A). Dos estudios describen una menor respuesta al fármaco en los pacientes portadores del alelo G que los portadores del alelo A (Hayashi et al. 2013; Drozdik et al. 2007). Otros investigadores, incluido nuestro grupo de trabajo, no han encontrado dicha asociación (S. a Owen et al. 2013; Stamp et al. 2010; Takatori et al. 2015; Bohanec Grabar et al. 2008; Kato et al. 2012; Yanagimachi et al. 2011).

En cuanto a la toxicidad del fármaco, dos estudios (Bohanec Grabar et al. 2012; Samara, Irshaid, and Mustafa 2014) han descrito una asociación entre los portadores del alelo G del SNP rs1051266 y la presencia de efectos adversos, pero con resultados opuestos entre ellos. De nuevo, ninguno de estos resultados han sido replicados ni por otros investigadores ni por

nosotros (Yanagimachi et al. 2011; Plaza-Plaza et al. 2012; Takatori et al. 2015; Stamp et al. 2010; S. a Owen et al. 2013; Wessels et al. 2006; Drozdik et al. 2007).

Recientemente, un estudio ha detectado asociaciones significativas con otros polimorfismos de SLC19A1 (rs11702425, rs2838956, rs7499, rs2274808, rs9977268, rs7279445) y la eficacia del MTX, (S. a Owen et al. 2013), pero estos resultados no han sido reproducidos en otros estudios.

SLC19A1								
SNP	Referencia	Año	Población	n	Eficacia	Res. de Eficacia	Toxicidad	Res. de toxicidad
rs1051266 G80A	Plaza-Plaza.,	2012	España	67	NE		NS	-
	Takatori et al.,	2006	Japón	124	NS	-	NS	-
	Stamp et al.,	2010	Nueva Zelanda	200	NS	-	NS	-
	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	NS	-	NS	-
	Wessels et al.,	2006	Holanda	205	NS	-	NS	-
	Drozdik et al.,	2007	Polonia	174	S	A ↑ eficacia	NS	-
	Hayashi et al.,	2013	Japón	89	S	G ↓ eficacia	NE	
	Bohanec et al.,	2008	Eslovenia	213	NS	-	S	G ↑ toxicidad
	Kato et al.,	2012	Japón	55	NS	-	NE	
	Yangimachi et al.,	2011	Japón	92	NS	-	NS	-
Samara et al.,	2014	Jordania	159	NS	-	S	TT ↑ toxicidad	
rs11702425 1920T>C	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	TT ↑ eficacia	NS	-
rs2838956 3939465A>G	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	AA ↑ eficacia	NS	-
rs7499 16G>A	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	GG ↑ eficacia	NS	-
rs2274808 86531C>T	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	CC ↑ eficacia	NS	-
rs9977268 87191C>T	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	CC ↑ eficacia	NS	-
rs7279445 99822C>T	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	CC ↑ eficacia	NS	-

↓: Menor, ↑: Mayor, NS: No significativo, S: Significativo, NE: no evaluado.

Tabla 12. Revisión de los estudios publicados del gen SLC19A1/RFC-1 relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

A parte del SNP rs1051266, comentado previamente, en el presente trabajo también hemos estudiado otros polimorfismos del gen SLC19A1 (rs4818789 y rs2838957). No encontramos asociación estadística entre los mencionados SNPs y la toxicidad y eficacia del MTX en nuestra cohorte de pacientes con AR.

4.2.2. Folipoliglutamato sintetasa (FPGS)

Se han intentado relacionar polimorfismos de este gen con la toxicidad y eficacia del MTX con resultados poco exitosos (Tabla 13).

Destacan los resultados de Sharma *et al.* que describen una relación significativa entre los pacientes portadores del alelo A en rs1544105 y una menor eficacia al MTX.

Asimismo, Owen y *et al.* (S. a Owen et al. 2013) estudiaron varios SNPs del gen en una cohorte de 309 pacientes con AR. Describieron una tendencia a la significación entre rs4451422 y rs1054774 y la toxicidad a MTX. Davis *et al.* también estudiaron otros polimorfismos del gen FPGS y su relación con la presencia de efectos adversos al tratamiento con MTX en 319 pacientes con AR (Davis et al. 2014). Describieron una asociación significativa en un modelo combinado entre heterocigotos para el polimorfismo rs7033913 del gen FPGS y homocigotos para el polimorfismo rs11988534 del gen GGH. Desde un punto de vista biológico, una asociación significativa con heterocigotos para un SNP es discutible. Existen tres tipos de modelos de herencia: dominante, recesiva y aditiva. Por ejemplo, en el modelo aditivo, los heterocigotos pueden tener mayor probabilidad de asociación que los homocigotos mutados, pero entonces los homocigotos normales, deberían tener aun mayor efecto para que ésta hipótesis sea biológicamente plausible.

FPGS								
SNP	Referencia	Año	Población	n	Eficacia	Res. de Eficacia	Toxicidad	Res. de toxicidad
rs1054774 59719530T>A	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	NE		tS	A ↑ toxicidad
rs1544105 2572C>T	Sharma et al.,	2009	India	281	S	AA ↓eficacia	NE	
rs4451422 16444A>C	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	NE		tS	C ↑ toxicidad
rs10760502 114G>A	Van der Straaten et al.,	2007	Holanda	352	NS	-	NS	-
rs 10106 1194 A>G	Van der Straaten et al.,	2007	Holanda	352	NS	-	NS	-
	Davis et al.,	2014	USA	319	NS	-	NS	-
rs7033913 914C>T	Davis et al.,	2014	USA	319	NS	-	NS	-
rs10760503 43644T>C	Davis et al.,	2014	USA	319	NS	-	NS	-

↓: Menor, ↑:Mayor, NS: No significativo, S:Significativo, NE: No evaluado, tS: Tendencia a la significación estadística.

Tabla 13. Revisión de los estudios publicados del gen FPGS relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

En nuestro estudio analizamos tres variantes genéticas de FPGS (rs10106, rs10987742, rs10760502). Entre los resultados obtenidos destacan: 1) una asociación significativa entre rs10987742 y la respuesta al tratamiento, 2) una asociación significativa entre rs10106 y la respuesta al tratamiento, el tiempo de supervivencia del fármaco en monoterapia y la

presencia de eventos adversos, y 3) una tendencia a la significación estadística entre rs10760502 y el tiempo de supervivencia del fármaco en monoterapia.

Otros grupos de investigación (Davis et al. 2014; van der Straaten et al. 2007) que estudiaron el polimorfismo rs10106, a diferencia de nosotros, no encontraron una asociación estadística entre los efectos adversos y/o eficacia del MTX en población con AR. Del mismo modo, Yanagimachi *et al.* tampoco encontraron asociación entre este polimorfismo y la eficacia del MTX en una población con Artritis idiopática juvenil (Yanagimachi et al. 2011). Las discrepancias entre los resultados de los trabajos descritos y el nuestro podrían deberse a las diferencias entre las variables escogidas (eficacia medida como una variable continua y tiempo de supervivencia del fármaco).

4.2.3. ATP-binding cassette B1 (ABCB1)

La variabilidad entre pacientes en la respuesta al tratamiento está condicionada por diversos factores. Uno de ellos es el nivel intracelular del fármaco, el cual, a su vez, está determinado, en parte, por los transportadores de membrana. Así, variaciones genéticas que alteran los niveles de expresión y/o la actividad de los transportadores, pueden condicionar la respuesta y/o toxicidad. Los transportadores ATP-binding cassette están implicados en el eflujo del MTX, y concretamente ABCB1, es uno de los genes más estudiados como posible marcador farmacogenético (Tabla 14).

De todos los SNPs estudiados, la variante rs1045642 (C3435T) situada en el exón 26 del gen (Hoffmeyer et al. 2000) es el que más veces se ha reportado. En relación a la eficacia, Kato, *et al.* y Pawlik, *et al.* (Kato et al. 2012; Pawlik et al. 2004) describieron una mejor respuesta del MTX en pacientes portadores del alelo T, contradiciendo los resultados de Takatori *et al.*, (Takatori et al. 2015) que describieron que los portadores del alelo T presentan una peor respuesta al fármaco. En concordancia con nuestros resultados, otros investigadores tampoco (Kooloos et al. 2010; Samara, Irshaid, and Mustafa 2014; Stamp et al. 2010; Bohanec Grabar et al. 2008) han encontrado asociación entre dicho polimorfismo y la eficacia del fármaco.

ABCB1								
SNP	Referencia	Año	Población	n	Eficacia	Res. de Eficacia	Toxicidad	Res. de toxicidad
rs1045642 3435C>T	Kato et al.,	2012	Japón	55	S	TT ↑ eficacia	NE	
	Plaza-plaza et al.,	2012	España	67	NE		S	CC↑toxicidad
	Kooloos et al.,	2010	Alemania	205	NS	-	S	TT↑toxicidad
	Samara et al.,	2014	Jordania	159	NS	-	S	TT↑toxicidad
	Pawlik et al.,	2004	Polonia	92	S	TT ↑ eficacia	NE	
	Takatori et al.,	2006	Japón	124	S	TT ↓ eficacia	NS	-
	Bohanec et al.,	2008	Eslovenia	213	NS	-	S	TT↑toxicidad
	Stamp et al.,	2010	Nueva Zelanda	200	NS	-	NS	-
Ranganathan et al.,	2008	USA	127	NE		NS	-	
rs2032582 2677GA/T	Kato et al.,	2012	Japón	55	S	AA/AT/TT ↑ eficacia	NE	
rs1128503 1236C>T	Kato et al.,	2012	Japón	55	NS	-	NE	
	Ranganathan et al.,	2008	USA	127	NE		S	TT ↑toxicidad

↓: Menor, ↑:Mayor, NS: No significativo, S:Significativo, NE: No evaluado

Tabla 14. Revisión de los estudios publicados del gen *ABCB1* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

En referencia a la toxicidad y el SNP rs1045642, también se han descrito resultados dispares. Tres grupos de investigación (Kooloos et al. 2010; Samara, Irshaid, and Mustafa 2014; Bohanec Grabar et al. 2008) describieron una mayor toxicidad en los portadores del alelo T, por el contrario, un grupo Español reportó una mayor toxicidad en los portadores del alelo C (Plaza-Plaza et al. 2012). Otros investigadores, entre ellos nuestro grupo de trabajo, no han descrito asociación entre toxicidad y este polimorfismo (Stamp et al. 2010; Takatori et al. 2015; Ranganathan et al. 2008). Existen diferentes motivos que pueden justificar la disparidad de resultados, entre ellos destacan el pequeño tamaño muestral de algunos estudios, las diferentes poblaciones a estudio (cada etnia presenta frecuencias de MAF diferentes) y las diferentes definiciones de toxicidad escogidas en cada uno de ellos.

Otros polimorfismos del gen *ABCB1* también han sido estudiados. Destacan los resultados de 2 polimorfismos: rs2032582 y rs1128503. El polimorfismo rs2032582 (G2677T/A), es un polimorfismo no-sinónimo que modifica dos aminoácidos en la posición 899 del gen (Alanina por Tyrosina o Serina). Kato *et al.* (Kato et al. 2012) describieron una asociación entre la variante rs2032582 y la eficacia del MTX en una población de 55 pacientes con AR. Del mismo modo, Ranganathan *et al.* describieron una asociación entre la variante rs1128503 y la toxicidad del fármaco (Ranganathan et al. 2008).

De todos los polimorfismos estudiados en nuestro grupo de trabajo, los resultados describen una asociación entre rs868755, rs10280623 y rs1858923 y la toxicidad presentada al fármaco. El polimorfismo rs868755 se presenta en fuerte desequilibrio de ligamiento con rs1128503 y rs2032582 ($r^2=0.941$ and $r^2=0.885$, respectivamente). Por lo que nuestro resultado podría validar los resultados de toxicidad asociada a MTX descrita por Ranganathan *et al.* (Ranganathan et al. 2008).

En relación a rs10280623 y la toxicidad asociada al fármaco que nuestro grupo ha descrito, no existen en la literatura otros autores que hayan estudiado esta variante previamente. La falta de estudios realizados con este SNP puede deberse a la selección de tagSNP realizada. Recordemos que se seleccionaron aquellos SNPTag que presentaban un alto desequilibrio de ligamiento. Dado que el desequilibrio de ligamiento hace referencia a la disposición no casual de alelos en dos *loci*, los alelos a estudio serán heredados conjuntamente, por lo que el tagSNP a estudio hacen referencia al SNP estudiado en cuestión y al conjunto de alelos que irán asociados al mismo. De este modo el estudio del gen es más exhaustivo que al analizar únicamente las variantes funcionales descritas.

A pesar de la cantidad de información disponible para determinar la contribución genética de ABCB1 en la respuesta y toxicidad del MTX, los resultados de los estudios hasta la fecha publicados no son concordantes.

4.2.4. Gamma glutamil hidrolasa (GGH)

La GGH tiene la función de revertir la poliglutamación del MTX y, de este modo, permite que pueda ser extraído de la célula. Por lo que variaciones genéticas que afecten a su funcionalidad también pueden ser indicadoras de una falta de eficacia del fármaco o de una toxicidad asociada a éste (Tabla 15).

Owen *et al.* (S. a Owen et al. 2013) describen una asociación con ser portador del alelo T en rs12681874 (14269G>A) y la mayor eficacia al MTX en pacientes con AR. Por el contrario, el estudio de otros SNPs de este gen, rs11545078 (Kato et al. 2012; Yanagimachi et al. 2011; Jekic et al. 2013), rs719235 (Jekic et al. 2013) y rs1800909 (Yanagimachi et al. 2011) no ha demostrado una asociación con la eficacia del fármaco.

En relación a la toxicidad, se ha descrito que los polimorfismos rs719235 (Jekic et al. 2013) y rs1800909 (Yanagimachi et al. 2011) están asociados a una mayor toxicidad del MTX. Nuestros resultados, al no encontrar asociación significativa entre rs1800909 y la toxicidad al fármaco, son discordantes a los resultados de Yanagimachi *et al.*,

Estudios en los que se analizan otros polimorfismos de este gen (rs12681874 y rs11545078) no encuentran asociaciones significativas (Yanagimachi et al. 2011; Jekic et al. 2013; S. a Owen et al. 2013).

GGH								
SNP	Referencia	Año	Población	n	Eficacia	Res. de Eficacia	Toxicidad	Res. de toxicidad
rs11545078 452C>T	Kato et al.,	2012	Japón	55	NS	-	NE	
	Yanagimachi et al.,	2011	Japón	92	NS	-	NS	-
	Jekic et al.,	2013	Serbia	184	NS	-	NS	-
rs12681874 14269G>A	Owen et al.,	2013	Reino Unido	309	S	TT↑eficacia	NS	-
rs719235 354G>T	Jekic et al.,	2013	Serbia	184	NS	-	S	GG↑toxicidad
rs1800909 16T>C	Yanagimachi et al.,	2011	Japón	92	NS	-	S	TT↑toxicidad

↓: Menor, ↑: Mayor, NS: No significativo, S: Significativo

Tabla 15. Revisión de los estudios publicados del gen *GGH* relacionados con la eficacia y la toxicidad por metotrexato en la artritis reumatoide.

Del resto de polimorfismos del gen de *GGH* que estudia el presente trabajo (rs11995525, rs7010484, rs3780130, rs11545077, rs13248452), no encontramos relación entre ellos y la eficacia y/o toxicidad del MTX en la población estudiada.

4.3. ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS DEL METOTREXATO EN ARTRITIS REUMATOIDE. ACTUALIZACIÓN Y LIMITACIONES

El MTX puede producir reacciones adversas, que resultan en una importante morbilidad y mortalidad en pacientes así como en un aumento en los costes de salud. Además no todos los pacientes con AR responden del mismo modo al mismo tratamiento, por lo que se pierde tiempo en su “respuesta”, un tiempo que para enfermedades como la AR es fundamental para evitar secuelas como la destrucción articular, hecho que también aumenta los costes de salud medidos como incapacidad y bajas laborales.

En términos generales, las guías terapéuticas de la AR, consideran que los pacientes son un conjunto homogéneo y que, por consiguiente, los medicamentos eficaces y bien tolerados en unos lo serán también en el resto. La experiencia clínica, sin embargo, muestra una realidad

distinta: el MTX funciona bien en algunos pacientes, pero es ineficaz o causa reacciones adversas en otros.

Estas variaciones individuales en la respuesta o toxicidad al MTX pueden deberse a la influencia de factores endógenos, como son los factores genéticos. La variabilidad genética de un individuo en su respuesta a determinados fármacos es el objetivo de estudio de la farmacogenética.

El MTX debe pasar por numerosas etapas antes de llegar al tejido u órgano diana. Así, cuando se administra, éste debe ser absorbido, metabolizado, transportado, degradado y excretado del interior del organismo. Si en alguno de estos pasos existieran diferencias genéticas, por pequeñas que sean, la variación en la secuencia de un gen de alguna de estas proteínas originaría una proteína distinta, que al interactuar con el fármaco, daría lugar a una respuesta distinta, que podría ocasionar efectos adversos o bien una respuesta inadecuada al fármaco.

El conocer que perfil genético se asocia a una mayor eficacia y presencia de menores efectos adversos a través del estudio farmacogenético tiene grandes beneficios:

1) Selección personalizada del fármaco: La farmacogenética nos ayuda en escoger desde un inicio el tratamiento que va ser más efectivo (tanto por la eficacia del fármaco como por la menor presencia de efectos adversos). De este modo, evitamos la “escalada terapéutica” y ganamos tiempo de acción desde el inicio de la enfermedad. El seleccionar el mejor fármaco para cada paciente desde el inicio de la enfermedad aporta numerosos beneficios. En la AR se ha descrito el concepto de “la ventana de la oportunidad” que hace referencia a que cuanto antes se controle la actividad de la AR mejor pronóstico y menores secuelas desarrollaran los pacientes.

2) Evitar efectos adversos: Identificar a aquellos pacientes van a presentar efectos adversos que puedan ocasionar una discontinuación del tratamiento. Al evitar desde un inicio aquellos tratamientos que van a tener que ser suspendidos por toxicidad, ganamos tiempo a la enfermedad. Asimismo evitamos efectos adversos que puedan estar asociados al fármaco y que produzcan un inconveniente para el paciente y un aumento de los costes.

3) Ahorrar costes: Escoger el mejor fármaco para cada paciente individualizado permite ahorrar costes tanto directos como indirectos. Ahorra costes directos en gastos de farmacia (al administrar un tratamiento que no será efectivo), y costes indirectos o no tangibles como son las visitas médicas más frecuentes debido a una mal control de la enfermedad o con el objetivo

de controlar los efectos adversos, o como la incapacidad laboral temporal, permanente o incluso absoluta secundaria a las secuelas de la misma enfermedad.

3) Ajustar dosis: Poder administrar dosis más elevadas desde el inicio en aquellos pacientes que no sean portadores de los polimorfismos que se asocian a toxicidad. De este modo, ganamos tiempo en la respuesta al fármaco y evitamos dar el fármaco a aquellos pacientes con un perfil farmacogenético inadecuado.

En esta tesis se han realizado dos trabajos en los que metodológicamente cabe destacar el gran trabajo de campo realizado en la selección y recogida de variables clínicas, la homogeneidad en la muestra incluida y la meticulosa selección de los polimorfismos a genotipar.

Para la recogida de datos clínicos se elaboró un cuaderno de datos en el que se incluyeron variables demográficas, antecedentes patológicos, enfermedades de base, variables de la artritis reumatoide y tratamientos previos al inicio del MTX. La actividad y respuesta al tratamiento fue medida con el índice de actividad de la enfermedad DAS28 al inicio del tratamiento, después de 6 meses y en el momento de la recogida de los datos. Los efectos adversos fueron recogidos a través de las historias clínicas y exploraciones complementarias de los pacientes, categorizándolos según se muestra en el Anexo 1.

Todos los pacientes incluidos en los estudios estaban en tratamiento en monoterapia, lo que motiva una muestra homogénea y evita que el uso de otros FMEs pudiera artefactar la toxicidad o respuesta al MTX.

Por otro lado, la eficacia del MTX fue recogida como una variable continua. Se tuvo en cuenta la diferencia en la puntuación del índice DAS28 (escala de referencia en la guía americana y europea para valorar la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento) al inicio y a los 6 meses desde el inicio del tratamiento, a diferencia de otros grupos que definen eficacia como una variable dicotómica, definiendo como “respondedores” aquellos pacientes que presentan un DAS28 inferior a 2.4 y “no respondedores” a los que presentan cifras superiores a los 6 meses. Medir la eficacia como una variable continua y no cualitativa dicotómica otorga precisión al estudio al medir la eficacia con mayor exactitud.

Asimismo, en el segundo estudio, introducimos la variable “supervivencia del fármaco”. Una variable comúnmente utilizada en otras especialidades como la oncología médica, pero poco habitual en Reumatología. Consideramos que esta medida tiene gran importancia clínica en los pacientes afectos de AR, dado que la primera etapa de la enfermedad marca el pronóstico de

la misma, y si un fármaco tiene un tiempo de supervivencia corto, quizás sería conveniente empezar con terapia combinada o con un fármaco que tenga otra diana terapéutica, con el objetivo de ganar tiempo de respuesta.

Referente a la selección de polimorfismos, se realizó un minucioso trabajo de campo. Los SNPs de los genes estudiados en esta tesis fueron seleccionados de tres modos: 1) Revisión de la literatura publicada (NCBI PubMed), 2) el navegador HapMap y 3) el software Haploview v.4.2. Se seleccionaron aquellos SNPTag que presentaban un desequilibrio de ligamiento (r^2) superior al 0,8 con el fin de encontrar asociación entre la respuesta y toxicidad al MTX. El estudio de SNPTag permite capturar la variabilidad de cada uno de los bloques haplotípicos sin necesidad de genotipar de estudiar todos los polimorfismos que forman parte de las regiones cromosómicas donde se localizan los genes a estudio. De este modo, se redujo el gasto y el tiempo utilizado en el mapeo genético. Asimismo, con el objetivo de poder encontrar asociación entre los polimorfismos más frecuentes en la población estudiada se seleccionaron aquellos SNPs que presentaban una frecuencia del alelo minoritario (MAF) > 10% en población caucásica. El realizar la selección de SNPs con estos criterios metodológicos, se consideraron todas las posibles variaciones genéticas de aquellos genes que participan directa o indirectamente en el metabolismo y en el transporte del MTX.

A pesar de todos los beneficios que aporta la farmacogenética en la aproximación de la medicina personalizada no es un área exenta de limitaciones. Para su aplicación en la práctica clínica es necesaria una validación que depende, en gran medida, de la replicación de los resultados en distintas poblaciones o en cohortes de gran tamaño. Sin embargo, esta replicación no es sencilla, ya que intervienen muchos factores como las diferencias en las frecuencias alélicas y las relaciones de desequilibrio de ligamiento entre distintas poblaciones o las diferencias en las variables seleccionadas para medir la toxicidad y efectividad entre los distintos estudios publicados. Por otra parte, la complejidad de las interacciones multigénicas y la influencia del ambiente muchas veces hace difícil trasladar los hallazgos farmacogenéticos a la práctica clínica.

En la última década, se han realizado estudios farmacogenéticos relevantes en el área de la artritis reumatoide y el metotrexato. El esfuerzo conjunto de los diferentes equipos de investigación interesados en el tema abocará, sin duda, a un mayor éxito en el tratamiento con MTX de los pacientes afectados de artritis reumatoide.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.- La farmacogenética es un instrumento útil para la identificación de aquellos polimorfismos que se asocian a mayor eficacia y menores efectos adversos.

2.- Un 42,8% de los pacientes con artritis reumatoide tratados con metotrexato a régimen de monoterapia presentan por lo menos un efecto adverso, y en un 26,3% de los pacientes el fármaco es retirado debido a un efecto adverso.

3.- El metotrexato es ineficaz en el 13,9% de los pacientes con artritis reumatoide tratados en régimen de monoterapia.

4.- Los polimorfismos rs16853826 y rs10197559 en el gen ATIC y rs868755 en el gen ABCB1, se asocian con mayor toxicidad al metotrexato en pacientes con artritis reumatoide.

5.- Los polimorfismos rs17421511 y rs1476413 en el gen MTHFR, rs1643650 en el gen DHFR y rs10987742 y rs10106 del gen FPGS se asocian con mayor eficacia del metotrexato en pacientes con artritis reumatoide.

6.- Los polimorfismos rs10760502 y rs10106 del gen FPGS, involucrados en la farmacocinética del metotrexato, están asociados a un mayor tiempo de supervivencia del fármaco en pacientes con artritis reumatoide tratados a régimen de monoterapia.

BIBLIOGRAFIA

- Aho, K, T Palusuo, and P Kurki. 1994. "Marker Antibodies of Rheumatoid Arthritis: Diagnostic and Pathogenetic Implications." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 23 (6): 379–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7524151>.
- Alamanos, Yannis, Paraskevi V Voulgari, and Alexandros A Drosos. 2006. "Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 36 (3): 182–88. doi:10.1016/j.semarthrit.2006.08.006.
- Alarcón, G S, W D Blackburn, A Calvo, and O Castañeda. 1987. "Evaluation of the American Rheumatism Association Preliminary Criteria for Remission in Rheumatoid Arthritis: A Prospective Study." *The Journal of Rheumatology* 14 (1): 93–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553590>.
- Aletaha, Daniel, Valerie P K Nell, Tanja Stamm, Martin Uffmann, Stephan Pflugbeil, Klaus Machold, and Josef S Smolen. 2005. "Acute Phase Reactants Add Little to Composite Disease Activity Indices for Rheumatoid Arthritis: Validation of a Clinical Activity Score." *Arthritis Research & Therapy* 7 (4): R796–806. doi:10.1186/ar1740.
- Aletaha, Daniel, Tuhina Neogi, Alan J Silman, Julia Funovits, David T Felson, Clifton O Bingham, Neal S Birnbaum, Gerd R Burmester, Vivian P Bykerk, Marc D Cohen, Bernard Combe, Karen H Costenbader, Maxime Dougados, Paul Emery, Gianfranco Ferraccioli, Johanna M W Hazes, Kathryn Hobbs, Tom W J Huizinga, Arthur Kavanaugh, Jonathan Kay, Tore K Kvien, Timothy Laing, Philip Mease, Henri A Ménard, Larry W Moreland, Raymond L Naden, Theodore Pincus, Josef S Smolen, Ewa Stanislawska-Biernat, Deborah Symmons, Paul P Tak, Katherine S Upchurch, Jirí Vencovsky, et al. 2010. "2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative." *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (9): 1580–88. doi:10.1136/ard.2010.138461.
- Aletaha, Daniel, Tuhina Neogi, Alan J Silman, Julia Funovits, David T Felson, Clifton O Bingham, Neal S Birnbaum, Gerd R Burmester, Vivian P Bykerk, Marc D Cohen, Bernard Combe, Karen H Costenbader, Maxime Dougados, Paul Emery, Gianfranco Ferraccioli, Johanna M W Hazes, Kathryn Hobbs, Tom W J Huizinga, Arthur Kavanaugh, Jonathan Kay, Tore K Kvien, Timothy Laing, Philip Mease, Henri a Ménard, Larry W Moreland, Raymond L Naden, Theodore Pincus, Josef S Smolen, Ewa Stanislawska-Biernat, Deborah Symmons, Paul P Tak, Katherine S Upchurch, Jirí Vencovský, et al. 2010. "2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative." *Arthritis and Rheumatism* 62 (9): 2569–81. doi:10.1002/art.27584.
- Aletaha, Daniel, Michael M Ward, Klaus P Machold, Valerie P K Nell, Tanja Stamm, and Josef S Smolen. 2005. "Remission and Active Disease in Rheumatoid Arthritis: Defining Criteria for Disease Activity States." *Arthritis and Rheumatism* 52 (9): 2625–36. doi:10.1002/art.21235.
- Allebeck, P, A Ahlbom, K Ljungström, and E Allander. 1984. "Do Oral Contraceptives Reduce the Incidence of Rheumatoid Arthritis? A Pilot Study Using the Stockholm County Medical Information System." *Scandinavian Journal of Rheumatology* 13 (2): 140–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6740269>.

- Anderson, J J, G Wells, A C Verhoeven, and D T Felson. 2000. "Factors Predicting Response to Treatment in Rheumatoid Arthritis: The Importance of Disease Duration." *Arthritis and Rheumatism* 43 (1): 22–29. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<22::AID-ANR4>3.0.CO;2-9.
- Arend, W P. 1997. "The Pathophysiology and Treatment of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 40 (4): 595–97. doi:10.1002/1529-0131(199704)40:4<595::AID-ART1>3.0.CO;2-O.
- Arnett, F C, S M Edworthy, D A Bloch, D J McShane, J F Fries, N S Cooper, L A Healey, S R Kaplan, M H Liang, and H S Luthra. 1988. "The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 31 (3): 315–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796>.
- Ballina, J, L Carmona, V Villaverde, C Herna, R Gabriel, A Laffon, Study Group, San Carlos, and Hospital Cl. 2002. "The Prevalence of Rheumatoid Arthritis in the General Population of Spain," 88–95.
- Barton, Anne, John Bowes, Stephen Eyre, Kristian Spreckley, Anne Hinks, Sally John, and Jane Worthington. 2004. "A Functional Haplotype of the PADI4 Gene Associated with Rheumatoid Arthritis in a Japanese Population Is Not Associated in a United Kingdom Population." *Arthritis and Rheumatism* 50 (4): 1117–21. doi:10.1002/art.20169.
- Barton, Anne, Wendy Thomson, Xiayi Ke, Steve Eyre, Anne Hinks, John Bowes, Laura Gibbons, et al. 2008. "Re-Evaluation of Putative Rheumatoid Arthritis Susceptibility Genes in the Post-Genome Wide Association Study Era and Hypothesis of a Key Pathway Underlying Susceptibility." *Human Molecular Genetics* 17 (15): 2274–79. doi:10.1093/hmg/ddn128.
- Bathon, J M, R W Martin, R M Fleischmann, J R Tesser, M H Schiff, E C Keystone, M C Genovese, et al. 2000. "A Comparison of Etanercept and Methotrexate in Patients with Early Rheumatoid Arthritis." *The New England Journal of Medicine* 343 (22): 1586–93. doi:10.1056/NEJM200011303432201.
- Begovich, Ann B, Victoria E H Carlton, Lee A Honigberg, Steven J Schrodi, Anand P Chokkalingam, Heather C Alexander, Kristin G Ardlie, et al. 2004. "A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis." *American Journal of Human Genetics* 75 (2): 330–37. doi:10.1086/422827.
- Bengtsson, C, B Nordmark, L Klareskog, I Lundberg, and L Alfredsson. 2005. "Socioeconomic Status and the Risk of Developing Rheumatoid Arthritis: Results from the Swedish EIRA Study." *Annals of the Rheumatic Diseases* 64 (11): 1588–94. doi:10.1136/ard.2004.031666.
- Berkun, Y, D Levartovsky, A Rubinow, H Orbach, S Amar, T Grenader, I Abou Atta, D Mevorach, G Friedman, and A Ben-Yehuda. 2004. "Methotrexate Related Adverse Effects in Patients with Rheumatoid Arthritis Are Associated with the A1298C Polymorphism of the MTHFR Gene." *Annals of the Rheumatic Diseases* 63 (10): 1227–31. doi:10.1136/ard.2003.016337.

- Bessant, R, A Steuer, S Rigby, and M Gumpel. 2003. "Osmic Acid Revisited: Factors That Predict a Favourable Response." *Rheumatology (Oxford, England)* 42 (9): 1036–43. doi:10.1093/rheumatology/keg283.
- Boers, M, P Tugwell, D T Felson, P L van Riel, J R Kirwan, J P Edmonds, J S Smolen, N Khaltsev, and K D Muirden. 1994. "World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology Core Endpoints for Symptom Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials." *The Journal of Rheumatology. Supplement* 41 (September): 86–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7799394>.
- Bohanec Grabar, Petra, Luis J Leandro-García, Lucía Inglada-Pérez, Dušan Logar, Cristina Rodríguez-Antona, and Vita Dolžan. 2012. "Genetic Variation in the SLC19A1 Gene and Methotrexate Toxicity in Rheumatoid Arthritis Patients." *Pharmacogenomics* 13 (14): 1583–94. doi:10.2217/pgs.12.150.
- Bohanec Grabar, Petra, Dusan Logar, Boris Lestan, and Vita Dolzan. 2008. "Genetic Determinants of Methotrexate Toxicity in Rheumatoid Arthritis Patients: A Study of Polymorphisms Affecting Methotrexate Transport and Folate Metabolism." *European Journal of Clinical Pharmacology* 64 (11): 1057–68. doi:10.1007/s00228-008-0521-7.
- Brennan, P, C Bankhead, A Silman, and D Symmons. 1997. "Oral Contraceptives and Rheumatoid Arthritis: Results from a Primary Care-Based Incident Case-Control Study." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 26 (6): 817–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9213380>.
- Calero, Ismael, Jose Antonio Nieto, and Iñaki Sanz. 2010. "B Cell Therapies for Rheumatoid Arthritis: Beyond B Cell Depletion." *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 36 (2): 325–43. doi:10.1016/j.rdc.2010.02.003.
- Cáliz, R, J del Amo, A Balsa, F Blanco, L Silva, R Sanmarti, F G Martínez, et al. 2012. "The C677T Polymorphism in the MTHFR Gene Is Associated with the Toxicity of Methotrexate in a Spanish Rheumatoid Arthritis Population." *Scandinavian Journal of Rheumatology* 41 (1): 10–14. doi:10.3109/03009742.2011.617312.
- Cannon, G W. 1997. "Methotrexate Pulmonary Toxicity." *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 23 (4): 917–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9361161>.
- Chakravarty, K, P D Pharoah, and D G Scott. 1994. "A Randomized Controlled Study of Post-Injection Rest Following Intra-Articular Steroid Therapy for Knee Synovitis." *British Journal of Rheumatology* 33 (5): 464–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8173852>.
- Chan, Edwin S L, and Bruce N Cronstein. 2002. "Molecular Action of Methotrexate in Inflammatory Diseases." *Arthritis Research* 4 (4): 266–73. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=128935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chang, Monica, Charles M Rowland, Veronica E Garcia, Steven J Schrodi, Joseph J Catanese, Annette H M van der Helm-van Mil, Kristin G Ardlie, et al. 2008. "A Large-Scale Rheumatoid Arthritis Genetic Study Identifies Association at Chromosome 9q33.2." *PLoS Genetics* 4 (6): e1000107. doi:10.1371/journal.pgen.1000107.

- Chang, Sook Kyung, Zhizhan Gu, and Michael B Brenner. 2010. "Fibroblast-like Synoviocytes in Inflammatory Arthritis Pathology: The Emerging Role of Cadherin-11." *Immunological Reviews* 233 (1): 256–66. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00854.x.
- Chang, X, R Yamada, A Suzuki, T Sawada, S Yoshino, S Tokuhiko, and K Yamamoto. 2005. "Localization of Peptidylarginine Deiminase 4 (PADI4) and Citrullinated Protein in Synovial Tissue of Rheumatoid Arthritis." *Rheumatology (Oxford, England)* 44 (1): 40–50. doi:10.1093/rheumatology/keh414.
- Chen, P P, S Fong, and D A Carson. 1987. "Rheumatoid Factor." *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 13 (3): 545–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3324205>.
- Choi, Hyon K, Miguel A Hernán, John D Seeger, James M Robins, and Frederick Wolfe. 2002. "Methotrexate and Mortality in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Prospective Study." *Lancet* 359 (9313): 1173–77. doi:10.1016/S0140-6736(02)08213-2.
- Cooper, Thomas A, Lili Wan, and Gideon Dreyfuss. 2009. "RNA and Disease." *Cell* 136 (4): 777–93. doi:10.1016/j.cell.2009.02.011.
- Cornélis, F, S Fauré, M Martinez, J F Prud'homme, P Fritz, C Dib, H Alves, et al. 1998. "New Susceptibility Locus for Rheumatoid Arthritis Suggested by a Genome-Wide Linkage Study." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (18): 10746–50. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27966&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Costea, Irina, Albert Moghrabi, Caroline Laverdiere, Alexandru Graziani, and Maja Krajinovic. 2006. "Folate Cycle Gene Variants and Chemotherapy Toxicity in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia." *Haematologica* 91 (8): 1113–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870553>.
- Cronstein, B N, D Naime, and E Ostad. 1993. "The Antiinflammatory Mechanism of Methotrexate. Increased Adenosine Release at Inflamed Sites Diminishes Leukocyte Accumulation in an in Vivo Model of Inflammation." *The Journal of Clinical Investigation* 92 (6): 2675–82. doi:10.1172/JCI116884.
- Cronstein, Bruce N. 2005. "Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis." *Pharmacological Reviews* 57 (2): 163–72. doi:10.1124/pr.57.2.3.
- Davis, L A, B Polk, A Mann, R K Wolff, G S Kerr, A M Reimold, G W Cannon, T R Mikuls, and L Caplan. 2014. "Folic Acid Pathway Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Methotrexate Significant Adverse Events in United States Veterans with Rheumatoid Arthritis." *Clinical and Experimental Rheumatology* 32 (3): 324–32. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4167828&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- De Pablo, Paola, Thomas Dietrich, and Timothy E McAlindon. 2008. "Association of Periodontal Disease and Tooth Loss with Rheumatoid Arthritis in the US Population." *The Journal of Rheumatology* 35 (1): 70–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050377>.

- Deighton, C M, H Sykes, and D J Walker. 1993. "Rheumatoid Arthritis, HLA Identity, and Age at Menarche." *Annals of the Rheumatic Diseases* 52 (5): 322–26.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1005043&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Deighton, C M, D J Walker, I D Griffiths, and D F Roberts. 1989. "The Contribution of HLA to Rheumatoid Arthritis." *Clinical Genetics* 36 (3): 178–82.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2676268>.
- Dervieux, Thierry, Daniel Furst, Diana Orentas Lein, Robert Capps, Katie Smith, Michael Walsh, and Joel Kremer. 2004. "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 and Rheumatism* 50 (9): 2766–74. doi:10.1002/art.20460.
- Dervieux, Thierry, Neal Greenstein, and Joel Kremer. 2006. "Pharmacogenomic and Metabolic Biomarkers in the Folate Pathway and Their Association with Methotrexate Effects during Dosage Escalation in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 54 (10): 3095–3103. doi:10.1002/art.22129.
- Dixon, K H, B C Lanpher, J Chiu, K Kelley, and K H Cowan. 1994. "A Novel cDNA Restores Reduced Folate Carrier Activity and Methotrexate Sensitivity to Transport Deficient Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1): 17–20.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276792>.
- Doran, Michele F, Cynthia S Crowson, W Michael O'Fallon, and Sherine E Gabriel. 2004. "The Effect of Oral Contraceptives and Estrogen Replacement Therapy on the Risk of Rheumatoid Arthritis: A Population Based Study." *The Journal of Rheumatology* 31 (2): 207–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760786>.
- Dougados, M. 1996. "Synovial Fluid Cell Analysis." *Baillière's Clinical Rheumatology* 10 (3): 519–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876957>.
- Dreyer, S J, and S D Boden. 1999. "Natural History of Rheumatoid Arthritis of the Cervical Spine." *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 366 (September): 98–106.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627723>.
- Drozdik, M, T Rudas, A Pawlik, W Gornik, M Kurzawski, and M Herczynska. 2007. "Reduced Folate Carrier-1 80G>A Polymorphism Affects Methotrexate Treatment Outcome in Rheumatoid Arthritis." *The Pharmacogenomics Journal* 7 (6): 404–7.
 doi:10.1038/sj.tpj.6500438.
- Edwards, W, D A Willoughby, Experimental Pathology, and St Bartholomew. 1982. "Demonstration of Bone Marrow Derived Cells in Synovial Lining by Means of Giant Intracellular Granules as Genetic Markers," no. October 1980: 177–82.
- Edworthy, S M. 1999. "Morning Stiffness: Sharpening an Old Saw?" *The Journal of Rheumatology* 26 (5): 1015–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10332960>.

- Egsmose C, Lund B, Borg G, Pettersson H, Berg E, Brodin U et al. 1995. "Patients with Rheumatoid Arthritis Benefit from Early 2nd Line Therapy: 5 Year Followup of a Prospective Double Blind Placebo Controlled Study." *J Rheumatol* 12 (22): 2208–13.
- Elliott, M J, R N Maini, M Feldmann, J R Kalden, C Antoni, J S Smolen, B Leeb, F C Breedveld, J D Macfarlane, and H Bijl. 1994. "Randomised Double-Blind Comparison of Chimeric Monoclonal Antibody to Tumour Necrosis Factor Alpha (cA2) versus Placebo in Rheumatoid Arthritis." *Lancet* 344 (8930): 1105–10.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7934491>.
- Emery, P. 1997. "The Dunlop-Dottridge Lecture: Prognosis in Inflammatory Arthritis: The Value of HLA Genotyping and the Oncological Analogy." *The Journal of Rheumatology* 24 (7): 1436–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228150>.
- Faustino, Nuno André, and Thomas A Cooper. 2003. "Pre-mRNA Splicing and Human Disease." *Genes & Development* 17 (4): 419–37. doi:10.1101/gad.1048803.
- Felson, D T. 1993. "Choosing a Core Set of Disease Activity Measures for Rheumatoid Arthritis Clinical Trials." *The Journal of Rheumatology* 20 (3): 531–34.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478865>.
- Fernando, Michelle M A, Christine R Stevens, Emily C Walsh, Philip L De Jager, Philippe Goyette, Robert M Plenge, Timothy J Vyse, and John D Rioux. 2008. "Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis." *PLoS Genetics* 4 (4): e1000024. doi:10.1371/journal.pgen.1000024.
- Finckh, Axel, Matthew H Liang, Carmen Mugica van Herckenrode, and Paola de Pablo. 2006. "Long-Term Impact of Early Treatment on Radiographic Progression in Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis." *Arthritis and Rheumatism* 55 (6): 864–72.
doi:10.1002/art.22353.
- Fleming, A, J M Crown, and M Corbett. 1976. "Early Rheumatoid Disease. I. Onset." *Annals of the Rheumatic Diseases* 35 (4): 357–60.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1007396&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Galivan, J. 1980. "Evidence for the Cytotoxic Activity of Polyglutamate Derivatives of Methotrexate." *Molecular Pharmacology* 17 (1): 105–10.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6155601>.
- Ghodke, Yogita, Arvind Chopra, Kalpana Joshi, and Bhushan Patwardhan. 2008. "Are Thymidylate Synthase and Methylene Tetrahydrofolate Reductase Genes Linked with Methotrexate Response (efficacy, Toxicity) in Indian (Asian) Rheumatoid Arthritis Patients?" *Clinical Rheumatology* 27 (6): 787–89. doi:10.1007/s10067-008-0852-x.
- Gonzalez, Angel, Hilal Maradit Kremers, Cynthia S Crowson, Paulo J Nicola, John M Davis, Terry M Therneau, Veronique L Roger, and Sherine E Gabriel. 2007. "The Widening Mortality Gap between Rheumatoid Arthritis Patients and the General Population." *Arthritis and Rheumatism* 56 (11): 3583–87. doi:10.1002/art.22979.

- Gonzalez-Lopez, L, J I Gamez-Nava, G Jhangri, A S Russell, and M E Suarez-Almazor. 2000. "Decreased Progression to Rheumatoid Arthritis or Other Connective Tissue Diseases in Patients with Palindromic Rheumatism Treated with Antimalarials." *The Journal of Rheumatology* 27 (1): 41–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648016>.
- Goronzy, Jörg J, Eric L Matteson, James W Fulbright, Kenneth J Warrington, April Chang-Miller, Gene G Hunder, Thomas G Mason, et al. 2004. "Prognostic Markers of Radiographic Progression in Early Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 50 (1): 43–54. doi:10.1002/art.11445.
- Goyette, P, A Pai, R Milos, P Frosst, P Tran, Z Chen, M Chan, and R Rozen. 1998. "Gene Structure of Human and Mouse Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR)." *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 9 (8): 652–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9680386>.
- Grabar, Petra Bohanec, Sabina Rojko, Dusan Logar, and Vita Dolzan. 2010. "Genetic Determinants of Methotrexate Treatment in Rheumatoid Arthritis Patients: A Study of Polymorphisms in the Adenosine Pathway." *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (5): 931–32. doi:10.1136/ard.2009.111567.
- Gregersen, P K, J Silver, and R J Winchester. 1987. "The Shared Epitope Hypothesis. An Approach to Understanding the Molecular Genetics of Susceptibility to Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 30 (11): 1205–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2446635>.
- Grob, D, U Schütz, and G Plötz. 1999. "Occipitocervical Fusion in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 366 (September): 46–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627717>.
- Hannaford, P C, C R Kay, and S Hirsch. 1990. "Oral Contraceptives and Rheumatoid Arthritis: New Data from the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study." *Annals of the Rheumatic Diseases* 49 (10): 744–46. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1004223&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hayashi, Hideki, Yui Tazoe, Seiji Tsuboi, Masato Horino, Mariko Morishita, Teruhisa Arai, Motohiro Ohshima, et al. 2013. "A Single Nucleotide Polymorphism of Reduced Folate Carrier 1 Predicts Methotrexate Efficacy in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 28 (2): 164–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22971639>.
- Hazes, J M, B A Dijkmans, J P Vandenbroucke, R R de Vries, and A Cats. 1990. "Lifestyle and the Risk of Rheumatoid Arthritis: Cigarette Smoking and Alcohol Consumption." *Annals of the Rheumatic Diseases* 49 (12): 980–82. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1004291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Heliövaara, M, K Aho, A Reunanen, P Knekt, and A Aromaa. 1995. "Parity and Risk of Rheumatoid Arthritis in Finnish Women." *British Journal of Rheumatology* 34 (7): 625–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7670780>.

- Hernández Avila, M, M H Liang, W C Willett, M J Stampfer, G A Colditz, B Rosner, W N Roberts, C H Hennekens, and F E Speizer. 1990. "Reproductive Factors, Smoking, and the Risk for Rheumatoid Arthritis." *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 1 (4): 285–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2083305>.
- Hochberg, M C, and T D Spector. 1990. "Epidemiology of Rheumatoid Arthritis: Update." *Epidemiologic Reviews* 12 (January): 247–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2286222>.
- Hoffmeyer, S, O Burk, O von Richter, H P Arnold, J Brockmöller, A Johne, I Cascorbi, et al. 2000. "Functional Polymorphisms of the Human Multidrug-Resistance Gene: Multiple Sequence Variations and Correlation of One Allele with P-Glycoprotein Expression and Activity in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (7): 3473–78. doi:10.1073/pnas.050585397.
- Hughes, L B, T M Beasley, H Patel, H K Tiwari, S L Morgan, J E Baggott, K G Saag, et al. 2006. "Racial or Ethnic Differences in Allele Frequencies of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Their Influence on Response to Methotrexate in Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 65 (9): 1213–18. doi:10.1136/ard.2005.046797.
- Huizinga, Tom W J, Christopher I Amos, Annette H M van der Helm-van Mil, Wei Chen, Floris A van Gaalen, Damini Jawaheer, Geziena M T Schreuder, et al. 2005. "Refining the Complex Rheumatoid Arthritis Phenotype Based on Specificity of the HLA-DRB1 Shared Epitope for Antibodies to Citrullinated Proteins." *Arthritis and Rheumatism* 52 (11): 3433–38. doi:10.1002/art.21385.
- Huppa, Johannes B, and Mark M Davis. 2003. "T-Cell-Antigen Recognition and the Immunological Synapse." *Nature Reviews. Immunology* 3 (12): 973–83. doi:10.1038/nri1245.
- Iannaccone, Christine K, Yvonne C Lee, Jing Cui, Michelle L Frits, Roberta J Glass, Robert M Plenge, Daniel H Solomon, Michael E Weinblatt, and Nancy A Shadick. 2011. "Using Genetic and Clinical Data to Understand Response to Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drug Therapy: Data from the Brigham and Women's Hospital Rheumatoid Arthritis Sequential Study." *Rheumatology (Oxford, England)* 50 (1): 40–46. doi:10.1093/rheumatology/keq263.
- Irigoyen, Patricia, Annette T Lee, Mark H Wener, Wentian Li, Marlana Kern, Franak Batliwalla, Raymond F Lum, et al. 2005. "Regulation of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies in Rheumatoid Arthritis: Contrasting Effects of HLA-DR3 and the Shared Epitope Alleles." *Arthritis and Rheumatism* 52 (12): 3813–18. doi:10.1002/art.21419.
- Isaacs, John D. 2010. "The Changing Face of Rheumatoid Arthritis: Sustained Remission for All?" *Nature Reviews. Immunology* 10 (8): 605–11. doi:10.1038/nri2804.
- Isomäki, H. 1992. "Long-Term Outcome of Rheumatoid Arthritis." *Scandinavian Journal of Rheumatology. Supplement* 95 (January): 3–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1475632>.

- Iversen, Maura Daly, and Ingemar F Petersson. 2006. "Design Issues and Priorities in Team and Nonpharmacological Arthritis Care Research." *The Journal of Rheumatology* 33 (9): 1904–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960953>.
- Iwamoto, T, K Ikari, T Nakamura, M Kuwahara, Y Toyama, T Tomatsu, S Momohara, and N Kamatani. 2006. "Association between PADI4 and Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis." *Rheumatology (Oxford, England)* 45 (7): 804–7. doi:10.1093/rheumatology/kei023.
- Jacoby, R K, M I Jayson, and J A Cosh. 1973. "Onset, Early Stages, and Prognosis of Rheumatoid Arthritis: A Clinical Study of 100 Patients with 11-Year Follow-Up." *British Medical Journal* 2 (5858): 96–100. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1589106&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jahangier, Zalima N, Johannes W G Jacobs, Floris P J G Lafeber, Jan D Moolenburgh, Wijnand A A Swen, George A W Bruyn, Ed N Griep, Evert-J ter Borg, and Johannes W J Bijlsma. 2005. "Is Radiation Synovectomy for Arthritis of the Knee More Effective than Intraarticular Treatment with Glucocorticoids? Results of an Eighteen-Month, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial." *Arthritis and Rheumatism* 52 (11): 3391–3402. doi:10.1002/art.21376.
- James, Heather M, David Gillis, Pravin Hissaria, Susan Lester, Andrew A Somogyi, Leslie G Cleland, and Susanna M Proudman. 2008. "Common Polymorphisms in the Folate Pathway Predict Efficacy of Combination Regimens Containing Methotrexate and Sulfasalazine in Early Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Rheumatology* 35 (4): 562–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322994>.
- Jawaheer, Damini, and Peter K Gregersen. 2002. "Rheumatoid Arthritis. The Genetic Components." *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 28 (1): 1–15, v. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840692>.
- Jekic, Biljana, Ljiljana Lukovic, Vera Bunjevacki, Vera Milic, Ivana Novakovic, Tatjana Damjanovic, Jelena Milasin, et al. 2013. "Association of the TYMS 3G/3G Genotype with Poor Response and GGH 354GG Genotype with the Bone Marrow Toxicity of the Methotrexate in RA Patients." *European Journal of Clinical Pharmacology* 69 (3): 377–83. doi:10.1007/s00228-012-1341-3.
- Kang, S S, J Zhou, P W Wong, J Kowalisyn, and G Strokosch. 1988. "Intermediate Homocysteinemia: A Thermolabile Variant of Methylenetetrahydrofolate Reductase." *American Journal of Human Genetics* 43 (4): 414–21. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1715503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Karlson, E W, I M Lee, N R Cook, J E Manson, J E Buring, and C H Hennekens. 1999. "A Retrospective Cohort Study of Cigarette Smoking and Risk of Rheumatoid Arthritis in Female Health Professionals." *Arthritis and Rheumatism* 42 (5): 910–17. doi:10.1002/1529-0131(199905)42:5<910::AID-ANR9>3.0.CO;2-D.
- Karlson, Elizabeth W, Lori B Chibnik, Monica McGrath, Shun-Chiao Chang, Brendan T Keenan, Karen H Costenbader, Patricia A Fraser, et al. 2009. "A Prospective Study of Androgen

- Levels, Hormone-Related Genes and Risk of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis Research & Therapy* 11 (3): R97. doi:10.1186/ar2742.
- Kato, Tomomi, Akinobu Hamada, Shunsuke Mori, and Hideyuki Saito. 2012. "Genetic Polymorphisms in Metabolic and Cellular Transport Pathway of Methotrexate Impact Clinical Outcome of Methotrexate Monotherapy in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 27 (2): 192–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22104130>.
- Kim, Seong-Kyu, Jae-Bum Jun, Ahmed El-Soheemy, and Sang-Cheol Bae. 2006. "Cost-Effectiveness Analysis of MTHFR Polymorphism Screening by Polymerase Chain Reaction in Korean Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Methotrexate." *The Journal of Rheumatology* 33 (7): 1266–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16758511>.
- Klareskog, Lars, Patrik Stolt, Karin Lundberg, Henrik Källberg, Camilla Bengtsson, Johan Grunewald, Johan Rönnelid, et al. 2006. "A New Model for an Etiology of Rheumatoid Arthritis: Smoking May Trigger HLA-DR (shared Epitope)-Restricted Immune Reactions to Autoantigens Modified by Citrullination." *Arthritis and Rheumatism* 54 (1): 38–46. doi:10.1002/art.21575.
- Klippel JH, Dieppe PA, Eds. 1994. *Rheumatoid Synovitis and Pannus*. Edited by Rheumatology (2nd Ed). Mosby. London.
- Kooloos, Wouter M, Judith Am Wessels, Tahar van der Straaten, Cornelia F Allaart, Tom Wj Huizinga, and Henk-Jan Guchelaar. 2010. "Functional Polymorphisms and Methotrexate Treatment Outcome in Recent-Onset Rheumatoid Arthritis." *Pharmacogenomics* 11 (2): 163–75. doi:10.2217/pgs.09.139.
- Koopman WJ, ed. 1996. "Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis." In *Arthritis and Allied Condition (13th Ed)*., edited by Williams & Wilkins, 979–92. Baltimore (EE. UU.).
- Kortekangas, P, H T Aro, J Tuominen, and A Toivanen. 1992. "Synovial Fluid Leukocytosis in Bacterial Arthritis vs. Reactive Arthritis and Rheumatoid Arthritis in the Adult Knee." *Scandinavian Journal of Rheumatology* 21 (6): 283–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1475638>.
- Koskinen, Essi, Pekka Hannonen, and Tuulikki Sokka. 2009. "Palindromic Rheumatism: Longterm Outcomes of 60 Patients Diagnosed in 1967-84." *The Journal of Rheumatology* 36 (9): 1873–75. doi:10.3899/jrheum.090025.
- Kremer, Joel M. 2004. "Toward a Better Understanding of Methotrexate." *Arthritis and Rheumatism* 50 (5): 1370–82. doi:10.1002/art.20278.
- Krey, P R, and D A Bailen. 1979. "Synovial Fluid Leukocytosis. A Study of Extremes." *The American Journal of Medicine* 67 (3): 436–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/474588>.
- Kumagai, Kazuhiko, Keiko Hiyama, Tetsu Oyama, Hiroyuki Maeda, and Nobuoki Kohno. 2003. "Polymorphisms in the Thymidylate Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase Genes and Sensitivity to the Low-Dose Methotrexate Therapy in Patients with

- Rheumatoid Arthritis." *International Journal of Molecular Medicine* 11 (5): 593–600.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684695>.
- Kurreeman, F A S, D Rocha, J Houwing-Duistermaat, S Vrijmoet, V H Teixeira, P Migliorini, A Balsa, et al. 2008. "Replication of the Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 1/complement Component 5 Region as a Susceptibility Locus for Rheumatoid Arthritis in a European Family-Based Study." *Arthritis and Rheumatism* 58 (9): 2670–74.
 doi:10.1002/art.23793.
- Kurreeman, Fina A S, Leonid Padyukov, Rute B Marques, Steven J Schrodi, Maria Seddighzadeh, Gerrie Stoeken-Rijsbergen, Annette H M van der Helm-van Mil, et al. 2007. "A Candidate Gene Approach Identifies the TRAF1/C5 Region as a Risk Factor for Rheumatoid Arthritis." *PLoS Medicine* 4 (9): e278. doi:10.1371/journal.pmed.0040278.
- Kurzawski, Mateusz, Andrzej Pawlik, Krzysztof Safranow, Magdalena Herczynska, and Marek Drozdziak. 2007. "677C>T and 1298A>C MTHFR Polymorphisms Affect Methotrexate Treatment Outcome in Rheumatoid Arthritis." *Pharmacogenomics* 8 (11): 1551–59.
 doi:10.2217/14622416.8.11.1551.
- Landewé, Robert B M, Maarten Boers, Arco C Verhoeven, Rene Westhovens, Mart A F J van de Laar, Harry M Markusse, J Christiaan van Denderen, et al. 2002. "COBRA Combination Therapy in Patients with Early Rheumatoid Arthritis: Long-Term Structural Benefits of a Brief Intervention." *Arthritis and Rheumatism* 46 (2): 347–56.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840436>.
- Lane, Stephen K, and Joseph W Gravel. 2002. "Clinical Utility of Common Serum Rheumatologic Tests." *American Family Physician* 65 (6): 1073–80.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11925083>.
- Lee, D M, and M E Weinblatt. 2001. "Rheumatoid Arthritis." *Lancet* 358 (9285): 903–11.
 doi:10.1016/S0140-6736(01)06075-5.
- Lee, E G, D L Boone, S Chai, S L Libby, M Chien, J P Lodolce, and A Ma. 2000. "Failure to Regulate TNF-Induced NF-kappaB and Cell Death Responses in A20-Deficient Mice." *Science (New York, N.Y.)* 289 (5488): 2350–54.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3582399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lee, Yvonne C, Jing Cui, Karen H Costenbader, Nancy a Shadick, Michael E Weinblatt, and Elizabeth W Karlson. 2009. "Investigation of Candidate Polymorphisms and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients on Methotrexate." *Rheumatology (Oxford, England)* 48 (6): 613–17. doi:10.1093/rheumatology/ken513.
- Lehtinen, J T, K Kaarela, E A Belt, H J Kautiainen, M J Kauppi, and M U Lehto. 1999. "Incidence of Acromioclavicular Joint Involvement in Rheumatoid Arthritis: A 15 Year Endpoint Study." *The Journal of Rheumatology* 26 (6): 1239–41.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381036>.
- Lei, Cai, Zhang Dongqing, Shi Yeqing, Martin K Oaks, Chen Lishan, Jin Jianzhong, Qian Jie, et al. 2005. "Association of the CTLA-4 Gene with Rheumatoid Arthritis in Chinese Han

- Population." *European Journal of Human Genetics : EJHG* 13 (7): 823–28.
doi:10.1038/sj.ejhg.5201423.
- Lemoine, Sébastien, Ahsen Morva, Pierre Youinou, and Christophe Jamin. 2009. "Regulatory B Cells in Autoimmune Diseases: How Do They Work?" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173 (September): 260–67. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04651.x.
- Lineker, S, E Badley, C Charles, L Hart, and D Streiner. 1999. "Defining Morning Stiffness in Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Rheumatology* 26 (5): 1052–57.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10332967>.
- Majka, D S, K D Deane, L A Parrish, A A Lazar, A E Barón, C W Walker, M V Rubertone, W R Gilliland, J M Norris, and V M Holers. 2008. "Duration of Preclinical Rheumatoid Arthritis-Related Autoantibody Positivity Increases in Subjects with Older Age at Time of Disease Diagnosis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 67 (6): 801–7.
doi:10.1136/ard.2007.076679.
- Maksymowych, Walter P, Maria E Suarez-Almazor, Heidi Buenviaje, Bobbi-Lynn Cooper, Caroline Degeus, Michael Thompson, and Anthony S Russell. 2002. "HLA and Cytokine Gene Polymorphisms in Relation to Occurrence of Palindromic Rheumatism and Its Progression to Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Rheumatology* 29 (11): 2319–26.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415587>.
- Martínez, A, J Varadé, A Márquez, M C Cémit, L Espino, N Perdigones, J L Santiago, et al. 2008. "Association of the STAT4 Gene with Increased Susceptibility for Some Immune-Mediated Diseases." *Arthritis and Rheumatism* 58 (9): 2598–2602. doi:10.1002/art.23792.
- Masi, A T, R T Chatterton, and J C Aldag. 1999. "Perturbations of Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Adrenal Androgen Functions in Rheumatoid Arthritis: An Odyssey of Hormonal Relationships to the Disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* 876 (June): 53–62; discussion 62–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415593>.
- Matherly, Larry H, Zhanjun Hou, and Yijun Deng. 2007. "Human Reduced Folate Carrier: Translation of Basic Biology to Cancer Etiology and Therapy." *Cancer Metastasis Reviews* 26 (1): 111–28. doi:10.1007/s10555-007-9046-2.
- McInnes, Iain B, and Georg Schett. 2012. "The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis," 2205–19.
- McKendry, R J. 1997. "The Remarkable Spectrum of Methotrexate Toxicities." *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 23 (4): 939–54.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9361162>.
- Mena, J P, M Salazar-Páramo, L González-López, J I Gámez-Nava, L Sandoval-Ramirez, J D Sánchez, L E Figuera, F J Muñoz-Valle, M Vazquez del Mercado, and I P Dávalos. 2011. "Polymorphisms C677T and A1298C in the MTHFR Gene in Mexican Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Methotrexate: Implication with Elevation of Transaminases." *The Pharmacogenomics Journal* 11 (4): 287–91.
doi:10.1038/tpj.2010.32.

- Milic, Vera, Biljana Jekic, Ljiljana Lukovic, Vera Bunjevacki, Jelena Milasin, Ivana Novakovic, Tatjana Damnjanovic, et al. 2015. "Association of Dihydrofolate Reductase (DHFR) -317AA Genotype with Poor Response to Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Clinical and Experimental Rheumatology* 30 (2): 178–83. Accessed February 20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22324981>.
- Milicic, Anita, Dorothea Lee, Matthew A Brown, Chris Darke, and B Paul Wordsworth. 2002. "HLA-DR/DQ Haplotype in Rheumatoid Arthritis: Novel Allelic Associations in UK Caucasians." *The Journal of Rheumatology* 29 (9): 1821–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12233873>.
- Miossec, Pierre, Thomas Korn, and Vijay K Kuchroo. 2009. "Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells." *The New England Journal of Medicine* 361 (9): 888–98. doi:10.1056/NEJMra0707449.
- Mody GM, Cardiel MH. 2008. "Challenges in the Management of Rheumatoid Arthritis in Developing Countries." *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 22 (4): 621–41. doi:10.1016/j.berh.2008.04.003.
- Möttönen, Timo, Pekka Hannonen, Markku Korpela, Martti Nissilä, Hannu Kautiainen, Jorma Ilonen, Leena Laasonen, et al. 2002. "Delay to Institution of Therapy and Induction of Remission Using Single-Drug or Combination-Disease-Modifying Antirheumatic Drug Therapy in Early Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 46 (4): 894–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953964>.
- Mulero Mendoza, J, M A Contreras, C Barbadillo, and J L Andreu. 2000. "[Rheumatoid Arthritis. Epidemiology. Etiologic Factors]." *Revista Clínica Española* 200 Monog (May): 14–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10901021>.
- Nakamoto, Tokumasa. 2009. "Evolution and the Universality of the Mechanism of Initiation of Protein Synthesis." *Gene* 432 (1-2): 1–6. doi:10.1016/j.gene.2008.11.001.
- Nakamura, R M. 2000. "Progress in the Use of Biochemical and Biological Markers for Evaluation of Rheumatoid Arthritis." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 14 (6): 305–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138614>.
- Nielen, Markus M J, Dirkjan van Schaardenburg, Henk W Reesink, Rob J van de Stadt, Irene E van der Horst-Bruinsma, Margret H M T de Koning, Moud R Habibuw, Jan P Vandenbroucke, and Ben A C Dijkmans. 2004. "Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Study of Serial Measurements in Blood Donors." *Arthritis and Rheumatism* 50 (2): 380–86. doi:10.1002/art.20018.
- O’Dell, J R. 1997. "Methotrexate Use in Rheumatoid Arthritis." *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 23 (4): 779–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9361155>.
- Ollier, W E, L J Kennedy, W Thomson, A N Barnes, S C Bell, D Bennett, J M Angles, J F Innes, and S D Carter. 2001. "Dog MHC Alleles Containing the Human RA Shared Epitope Confer Susceptibility to Canine Rheumatoid Arthritis." *Immunogenetics* 53 (8): 669–73. doi:10.1007/s002510100372.

- Opipari, A W, M S Boguski, and V M Dixit. 1990. "The A20 cDNA Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha Encodes a Novel Type of Zinc Finger Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 265 (25): 14705–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2118515>.
- Owen, S a, S L Hider, P Martin, I N Bruce, a Barton, and W Thomson. 2013. "Genetic Polymorphisms in Key Methotrexate Pathway Genes Are Associated with Response to Treatment in Rheumatoid Arthritis Patients." *The Pharmacogenomics Journal* 13 (3). Nature Publishing Group: 227–34. doi:10.1038/tpj.2012.7.
- Owen, S A, M Lunt, J Bowes, S L Hider, I N Bruce, W Thomson, and A Barton. 2013. "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." *The Pharmacogenomics Journal* 13 (2): 137–47. doi:10.1038/tpj.2011.42.
- Pawlik, A, J Wrzesniewska, I Fiedorowicz-Fabrycy, and B Gawronska-Szklarz. 2004. "The MDR1 3435 Polymorphism in Patients with Rheumatoid Arthritis." *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 42 (9): 496–503. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15487808>.
- Pedersen, B K, and B Saltin. 2006. "Evidence for Prescribing Exercise as Therapy in Chronic Disease." *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 16 Suppl 1 (February): 3–63. doi:10.1111/j.1600-0838.2006.00520.x.
- Pikwer, M, U Bergström, J-A Nilsson, L Jacobsson, G Berglund, and C Turesson. 2009. "Breast Feeding, but Not Use of Oral Contraceptives, Is Associated with a Reduced Risk of Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 68 (4): 526–30. doi:10.1136/ard.2007.084707.
- Pinals, R S, A T Masi, and R A Larsen. 1981. "Preliminary Criteria for Clinical Remission in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 24 (10): 1308–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7306232>.
- Pincus, T. 1996. "Documenting Quality Management in Rheumatic Disease: Are Patient Questionnaires the Best (and Only) Method?" *Arthritis Care and Research : The Official Journal of the Arthritis Health Professions Association* 9 (5): 339–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8997923>.
- Pincus, T, L F Callahan, W G Sale, A L Brooks, L E Payne, and W K Vaughn. 1984. "Severe Functional Declines, Work Disability, and Increased Mortality in Seventy-Five Rheumatoid Arthritis Patients Studied over Nine Years." *Arthritis and Rheumatism* 27 (8): 864–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6431998>.
- Plaza-Plaza, José Cristian, Margarita Aguilera, Marisa Cañadas-Garre, Clarice Chemello, Alfonso González-Utrilla, María José Faus Dader, and Miguel Angel Calleja. 2012. "Pharmacogenetic Polymorphisms Contributing to Toxicity Induced by Methotrexate in the Southern Spanish Population with Rheumatoid Arthritis." *OmicS : A Journal of Integrative Biology* 16 (11): 589–95. doi:10.1089/omi.2011.0142.
- Plenge, Robert M, Leonid Padyukov, Elaine F Remmers, Shaun Purcell, Annette T Lee, Elizabeth W Karlson, Frederick Wolfe, et al. 2005. "Replication of Putative Candidate-Gene

- Associations with Rheumatoid Arthritis in >4,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4." *American Journal of Human Genetics* 77 (6): 1044–60. doi:10.1086/498651.
- Prasad, P D, S Ramamoorthy, F H Leibach, and V Ganapathy. 1995. "Molecular Cloning of the Human Placental Folate Transporter." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 206 (2): 681–87. doi:10.1006/bbrc.1995.1096.
- Prevoo, M L, M A van 't Hof, H H Kuper, M A van Leeuwen, L B van de Putte, and P L van Riel. 1995. "Modified Disease Activity Scores That Include Twenty-Eight-Joint Counts. Development and Validation in a Prospective Longitudinal Study of Patients with Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 38 (1): 44–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7818570>.
- Ranganathan, Prabha. 2008. "An Update on Methotrexate Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis." *Pharmacogenomics* 9 (4): 439–51. doi:10.2217/14622416.9.4.439.
- Ranganathan, Prabha, Robert Culverhouse, Sharon Marsh, Ami Mody, Tiffany J Scott-Horton, Richard Brasington, Amy Joseph, Virginia Reddy, Seth Eisen, and Howard L McLeod. 2008. "Methotrexate (MTX) Pathway Gene Polymorphisms and Their Effects on MTX Toxicity in Caucasian and African American Patients with Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Rheumatology* 35 (4): 572–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18381794>.
- Rasheed, Zafar, and Tariq M Haqqi. 2008. "Update on Targets of Biologic Therapies for Rheumatoid Arthritis." *Current Rheumatology Reviews* 4 (4): 246. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2822346&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Remmers, Elaine F, Robert M Plenge, Annette T Lee, Robert R Graham, Geoffrey Hom, Timothy W Behrens, Paul I W de Bakker, et al. 2007. "STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus." *The New England Journal of Medicine* 357 (10): 977–86. doi:10.1056/NEJMoa073003.
- Ritchie, D M, J A Boyle, J M McInnes, M K Jasani, T G Dalakos, P Grieveson, and W W Buchanan. 1968. "Clinical Studies with an Articular Index for the Assessment of Joint Tenderness in Patients with Rheumatoid Arthritis." *The Quarterly Journal of Medicine* 37 (147): 393–406. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4877784>.
- Roudier, J, G Rhodes, J Petersen, J H Vaughan, and D A Carson. 1988. "The Epstein-Barr Virus Glycoprotein gp110, a Molecular Link between HLA DR4, HLA DR1, and Rheumatoid Arthritis." *Scandinavian Journal of Immunology* 27 (4): 367–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2452474>.
- Samara, Sima A, Yacoub M Irshaid, and Khader N Mustafa. 2014. "Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A Polymorphisms with Methotrexate Toxicity and Response in Jordanian Rheumatoid Arthritis Patients." *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 52 (9): 746–55. doi:10.5414/CP202098.
- Scher, Jose U, and Steven B Abramson. 2011. "The Microbiome and Rheumatoid Arthritis." *Nature Reviews. Rheumatology* 7 (10): 569–78. doi:10.1038/nrrheum.2011.121.

- Schett, Georg. 2007. "Cells of the Synovium in Rheumatoid Arthritis. Osteoclasts." *Arthritis Research & Therapy* 9 (1): 203. doi:10.1186/ar2110.
- Schneider, Erasmus, and Thomas J Ryan. 2006. "Gamma-Glutamyl Hydrolase and Drug Resistance." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 374 (1-2): 25–32. doi:10.1016/j.cca.2006.05.044.
- Schrijver, I A, M J Melief, P P Tak, M P Hazenberg, and J D Laman. 2000. "Antigen-Presenting Cells Containing Bacterial Peptidoglycan in Synovial Tissues of Rheumatoid Arthritis Patients Coexpress Costimulatory Molecules and Cytokines." *Arthritis and Rheumatism* 43 (10): 2160–68. doi:10.1002/1529-0131(200010)43:10<2160::AID-ANR3>3.0.CO;2-T.
- Scott, D L, D P Symmons, B L Coulton, and A J Popert. 1987. "Long-Term Outcome of Treating Rheumatoid Arthritis: Results after 20 Years." *Lancet* 1 (8542): 1108–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2883443>.
- Seldin, M F, C I Amos, R Ward, and P K Gregersen. 1999. "The Genetics Revolution and the Assault on Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 42 (6): 1071–79. doi:10.1002/1529-0131(199906)42:6<1071::AID-ANR1>3.0.CO;2-8.
- Sewell, K L, and D E Trentham. 1993. "Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis." *Lancet* 341 (8840): 283–86. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sewell+K%2CTrentham+D.+Pathogenesis+of+rheumatoid+arthritis+.Lancet%2C+341+\(1993\)%2C+pp.+238-286](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sewell+K%2CTrentham+D.+Pathogenesis+of+rheumatoid+arthritis+.Lancet%2C+341+(1993)%2C+pp.+238-286).
- Sharma, Shruti, Mitashree Das, Ashok Kumar, Vishal Marwaha, Subramanian Shankar, Paramjeet Singh, Padmanabhan Raghu, et al. 2009. "Purine Biosynthetic Pathway Genes and Methotrexate Response in Rheumatoid Arthritis Patients among North Indians." *Pharmacogenetics and Genomics* 19 (10): 823–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19902562>.
- Sherrer, Y S, D A Bloch, D M Mitchell, D Y Young, and J F Fries. 1986. "The Development of Disability in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 29 (4): 494–500. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3707627>.
- Silman, A J. 2015. "Parity Status and the Development of Rheumatoid Arthritis." *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)* 28 (3-4): 228–30. Accessed May 6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1285886>.
- Silman AJ, Horchberg MC, eds. 1993. "Rheumatoid Arthritis." In *Epidemiology of the Rheumatic Diseases.*, Oxford: Ox, 7–68.
- Smerdel, Anna, Benedicte A Lie, Rafal Ploski, Bobby P C Koeleman, Øystein Førre, Erik Thorsby, and Dag E Undlien. 2002. "A Gene in the Telomeric HLA Complex Distinct from HLA-A Is Involved in Predisposition to Juvenile Idiopathic Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 46 (6): 1614–19. doi:10.1002/art.10337.
- Smolen, J S, F C Breedveld, M H Schiff, J R Kalden, P Emery, G Eberl, P L van Riel, and P Tugwell. 2003. "A Simplified Disease Activity Index for Rheumatoid Arthritis for Use in Clinical Practice." *Rheumatology (Oxford, England)* 42 (2): 244–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595618>.

- Smolen, Josef S, Robert Landewé, Ferdinand C Breedveld, Maxime Dougados, Paul Emery, Cecile Gaujoux-Viala, Simone Gorter, et al. 2010. "EULAR Recommendations for the Management of Rheumatoid Arthritis with Synthetic and Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs." *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (6): 964–75. doi:10.1136/ard.2009.126532.
- Spector, T D, and M C Hochberg. 1990. "The Protective Effect of the Oral Contraceptive Pill on Rheumatoid Arthritis: An Overview of the Analytic Epidemiological Studies Using Meta-Analysis." *Journal of Clinical Epidemiology* 43 (11): 1221–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147033>.
- Stamp, Lisa K, Peter T Chapman, John L O'Donnell, Mei Zhang, Jill James, Christopher Frampton, Murray L Barclay, Martin A Kennedy, and Rebecca L Roberts. 2010. "Polymorphisms within the Folate Pathway Predict Folate Concentrations but Are Not Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients on Methotrexate." *Pharmacogenetics and Genomics* 20 (6): 367–76. doi:10.1097/FPC.0b013e3283398a71.
- Stewart, C Andrew, Roger Horton, Richard J N Allcock, Jennifer L Ashurst, Alexey M Atrazhev, Penny Coghill, Ian Dunham, et al. 2004. "Complete MHC Haplotype Sequencing for Common Disease Gene Mapping." *Genome Research* 14 (6): 1176–87. doi:10.1101/gr.2188104.
- Suzuki, Akari, Ryo Yamada, Xiaotian Chang, Shinya Tokuhira, Tetsuji Sawada, Masakatsu Suzuki, Miyuki Nagasaki, et al. 2003. "Functional Haplotypes of PADI4, Encoding Citrullinating Enzyme Peptidylarginine Deiminase 4, Are Associated with Rheumatoid Arthritis." *Nature Genetics* 34 (4): 395–402. doi:10.1038/ng1206.
- Symmons, D P, C R Bankhead, B J Harrison, P Brennan, E M Barrett, D G Scott, and A J Silman. 1997. "Blood Transfusion, Smoking, and Obesity as Risk Factors for the Development of Rheumatoid Arthritis: Results from a Primary Care-Based Incident Case-Control Study in Norfolk, England." *Arthritis and Rheumatism* 40 (11): 1955–61. doi:10.1002/1529-0131(199711)40:11<1955::AID-ART6>3.0.CO;2-A.
- Szekanecz, Zoltán, and Alisa E Koch. 2010. "Vasculogenesis in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis Research & Therapy* 12 (2): 110. doi:10.1186/ar2943.
- Szeto, D W, Y C Cheng, A Rosowsky, C S Yu, E J Modest, J R Piper, C Temple, R D Elliott, J D Rose, and J A Montgomery. 1979. "Human Thymidylate Synthetase--III. Effects of Methotrexate and Folate Analogs." *Biochemical Pharmacology* 28 (17): 2633–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/518674>.
- Tak, P P, T J Smeets, M R Daha, P M Kluin, K A Meijers, R Brand, A E Meinders, and F C Breedveld. 1997. "Analysis of the Synovial Cell Infiltrate in Early Rheumatoid Synovial Tissue in Relation to Local Disease Activity." *Arthritis and Rheumatism* 40 (2): 217–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041933>.
- Takatori, R, K A Takahashi, D Tokunaga, T Hojo, M Fujioka, T Asano, T Hirata, et al. 2015. "ABC1 C3435T Polymorphism Influences Methotrexate Sensitivity in Rheumatoid Arthritis Patients." *Clinical and Experimental Rheumatology* 24 (5): 546–54. Accessed March 27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17181924>.

- Taniguchi, Atsuo, Wako Urano, Eiichi Tanaka, Shiori Furihata, Shigeo Kamitsuji, Eisuke Inoue, Mariko Yamanaka, Hisashi Yamanaka, and Naoyuki Kamatani. 2007. "Validation of the Associations between Single Nucleotide Polymorphisms or Haplotypes and Responses to Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Proposal for Prospective Pharmacogenomic Study in Clinical Practice." *Pharmacogenetics and Genomics* 17 (6): 383–90. doi:10.1097/01.fpc.0000236326.80809.b1.
- Taraborelli, M, L Andreoli, R Cattaneo, A Tincani, Laura Andreoli, Silvana Archetti, Angela Tincani, and E Xperimental R Heumatology. 2009. "Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Methotrexate : No Association with Response to Therapy nor with Drug-Related Adverse Events in an Italian Population of Rheumatic Patients," 499–502.
- Taşbaş, Ozgür, Pınar Borman, Halil Gürhan Karabulut, Ajlan Tükün, and Rezan Yorgancıoğlu. 2011. "The Frequency of A1298C and C677T Polymorphisms of the Methylenetetrahydrofolate Gene in Turkish Patients with Rheumatoid Arthritis: Relationship with Methotrexate Toxicity." *The Open Rheumatology Journal* 5 (January): 30–35. doi:10.2174/1874312901105010030.
- Tedesco, A, D D'Agostino, I Soriente, P Amato, R Piccoli, and P Sabatini. 2009. "A New Strategy for the Early Diagnosis of Rheumatoid Arthritis: A Combined Approach." *Autoimmunity Reviews* 8 (3): 233–37. doi:10.1016/j.autrev.2008.07.031.
- The Journal of Rheumatology*. 1993. "OMERACT, Conference on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. Proceedings. Maastricht, The Netherlands, April 29-May 3, 1992." 20 (3): 527–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8097535>.
- Thomas, R, and P E Lipsky. 1996. "Presentation of Self Peptides by Dendritic Cells: Possible Implications for the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 39 (2): 183–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849366>.
- Tornero Molina, Jesús, Raimon Sanmartí Sala, Vicente Rodríguez Valverde, Emilio Martín Mola, José Luis Marengo de la Fuente, Isidoro González Álvaro, Santiago Muñoz Fernández, et al. 2015. "[Update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the Management of Biologic Therapies in Rheumatoid Arthritis]." *Reumatología Clínica* 6 (1): 23–36. Accessed February 3. doi:10.1016/j.reuma.2009.10.006.
- Tsakonas, E, A A Fitzgerald, M A Fitzcharles, A Cividino, J C Thorne, A M'Seffar, L Joseph, C Bombardier, and J M Esdaile. 2000. "Consequences of Delayed Therapy with Second-Line Agents in Rheumatoid Arthritis: A 3 Year Followup on the Hydroxychloroquine in Early Rheumatoid Arthritis (HERA) Study." *The Journal of Rheumatology* 27 (3): 623–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10743799>.
- Tugwell, P, and M Boers. 1993. "Developing Consensus on Preliminary Core Efficacy Endpoints for Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. OMERACT Committee." *The Journal of Rheumatology* 20 (3): 555–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478872>.
- Ueda, Hironori, Joanna M M Howson, Laura Esposito, Joanne Heward, Hywel Snook, Giselle Chamberlain, Daniel B Rainbow, et al. 2003. "Association of the T-Cell Regulatory Gene CTLA4 with Susceptibility to Autoimmune Disease." *Nature* 423 (6939): 506–11. doi:10.1038/nature01621.

- Urano, Wako, Atsuo Taniguchi, Hisashi Yamanaka, Eiichi Tanaka, Hiroshi Nakajima, Yuko Matsuda, Hideto Akama, Yutaka Kitamura, and Naoyuki Kamatani. 2002. "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* 12 (3): 183–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927833>.
- Valdimarsson, H, and T Jónsson. 1996. "Predictive Value of Rheumatoid Factor Isotypes for Radiological Progression in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Scandinavian Journal of Rheumatology* 25 (3): 189–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8668967>.
- Van de Sande, M G H, M J H de Hair, C van der Leij, P L Klarenbeek, W H Bos, M D Smith, M Maas, et al. 2011. "Different Stages of Rheumatoid Arthritis: Features of the Synovium in the Preclinical Phase." *Annals of the Rheumatic Diseases* 70 (5): 772–77. doi:10.1136/ard.2010.139527.
- Van der Heide, A, J W Jacobs, J W Bijlsma, A H Heurkens, C van Booma-Frankfort, M J van der Veen, H C Haanen, et al. 1996. "The Effectiveness of Early Treatment with 'Second-Line' Antirheumatic Drugs. A Randomized, Controlled Trial." *Annals of Internal Medicine* 124 (8): 699–707. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8633829>.
- Van der Heijde, D M, M A van 't Hof, P L van Riel, L A Theunisse, E W Lubberts, M A van Leeuwen, M H van Rijswijk, and L B van de Putte. 1990. "Judging Disease Activity in Clinical Practice in Rheumatoid Arthritis: First Step in the Development of a Disease Activity Score." *Annals of the Rheumatic Diseases* 49 (11): 916–20. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1004262&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Van der Heijde, D M, M A van't Hof, P L van Riel, M A van Leeuwen, M H van Rijswijk, and L B van de Putte. 1992. "Validity of Single Variables and Composite Indices for Measuring Disease Activity in Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 51 (2): 177–81. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1005654&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Van der Put, N M, F Gabreëls, E M Stevens, J A Smeitink, F J Trijbels, T K Eskes, L P van den Heuvel, and H J Blom. 1998. "A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects?" *American Journal of Human Genetics* 62 (5): 1044–51. doi:10.1086/301825.
- Van der Straaten, R J H M, Judith A M Wessels, Jeska K de Vries-Bouwstra, Yvonne P M Goekoop-Ruiterman, Cornelia F Allaart, Judith Bogaartz, Marco Tiller, Tom W J Huizinga, and Henk-Jan Guchelaar. 2007. "Exploratory Analysis of Four Polymorphisms in Human GGH and FPGS Genes and Their Effect in Methotrexate-Treated Rheumatoid Arthritis Patients." *Pharmacogenomics* 8 (2): 141–50. doi:10.2217/14622416.8.2.141.
- Van Ede, A E, R F Laan, H J Blom, R A De Abreu, and L B van de Putte. 1998. "Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: An Update with Focus on Mechanisms Involved in Toxicity." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 27 (5): 277–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572710>.

- Van Ede, A E, R F Laan, H J Blom, T W Huizinga, C J Haagsma, B A Giesendorf, T M de Boo, and L B van de Putte. 2001. "The C677T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: A Genetic Risk Factor for Methotrexate-Related Elevation of Liver Enzymes in Rheumatoid Arthritis Patients." *Arthritis and Rheumatism* 44 (11): 2525–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710708>.
- Van Gestel, A M, R F Laan, C J Haagsma, L B van de Putte, and P L van Riel. 1995. "Oral Steroids as Bridge Therapy in Rheumatoid Arthritis Patients Starting with Parenteral Gold. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial." *British Journal of Rheumatology* 34 (4): 347–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7788149>.
- Van Gestel, A M, M L Prevoo, M A van 't Hof, M H van Rijswijk, L B van de Putte, and P L van Riel. 1996. "Development and Validation of the European League Against Rheumatism Response Criteria for Rheumatoid Arthritis. Comparison with the Preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Cri." *Arthritis and Rheumatism* 39 (1): 34–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546736>.
- Van Jaarsveld, C H, J W Jacobs, M J van der Veen, A A Blaauw, A A Kruize, D M Hofman, H L Brus, et al. 2000. "Aggressive Treatment in Early Rheumatoid Arthritis: A Randomised Controlled Trial. On Behalf of the Rheumatic Research Foundation Utrecht, The Netherlands." *Annals of the Rheumatic Diseases* 59 (6): 468–77. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1753160&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Van Riel, P L. 1992. "Provisional Guidelines for Measuring Disease Activity in Clinical Trials on Rheumatoid Arthritis." *British Journal of Rheumatology* 31 (12): 793–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1458283>.
- Van Riel, P L, and A M van Gestel. 2000. "Clinical Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 59 Suppl 1 (November): i28–31. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1766622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vang, Torkel, Mauro Congia, Maria Doloretta Macis, Lucia Musumeci, Valeria Orrú, Patrizia Zavattari, Konstantina Nika, et al. 2005. "Autoimmune-Associated Lymphoid Tyrosine Phosphatase Is a Gain-of-Function Variant." *Nature Genetics* 37 (12): 1317–19. doi:10.1038/ng1673.
- WATSON, J D, and F H CRICK. 1953. "Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." *Nature* 171 (4356): 737–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13054692>.
- Weinblatt, Michael E, Edward C Keystone, Daniel E Furst, Larry W Moreland, Michael H Weisman, Charles A Birbara, Leah A Teoh, Steven A Fischkoff, and Elliot K Chartash. 2003. "Adalimumab, a Fully Human Anti-Tumor Necrosis Factor Alpha Monoclonal Antibody, for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in Patients Taking Concomitant Methotrexate: The ARMADA Trial." *Arthritis and Rheumatism* 48 (1): 35–45. doi:10.1002/art.10697.
- Weinshilboum, Richard. 2003. "Inheritance and Drug Response." *The New England Journal of Medicine* 348 (6): 529–37. doi:10.1056/NEJMra020021.

- Weisman, Michael H, Daniel E Furst, Grace S Park, Joel M Kremer, Katie M Smith, Daniel J Wallace, Jacques R Caldwell, and Thierry Dervieux. 2006. "Risk Genotypes in Folate-Dependent Enzymes and Their Association with Methotrexate-Related Side Effects in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 54 (2): 607–12. doi:10.1002/art.21573.
- Wessels, Judith A M, Jeska K de Vries-Bouwstra, Bas T Heijmans, P Eline Slagboom, Yvonne P M Goekoop-Ruiterman, Cornelia F Allaart, Pit J S M Kerstens, et al. 2006. "Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated with Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes." *Arthritis and Rheumatism* 54 (4): 1087–95. doi:10.1002/art.21726.
- WILKINS, M H F, A R STOKES, and H R WILSON. 1953. "Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids." *Nature* 171 (4356): 738–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13054693>.
- Wolfe, F. 1996. "The Natural History of Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Rheumatology. Supplement* 44 (March): 13–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8833046>.
- Wolfe, F, and D J Hawley. 1985. "Remission in Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Rheumatology* 12 (2): 245–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4032401>.
- Wolfe, F, M Lassere, D van der Heijde, G Stucki, M Suarez-Almazor, T Pincus, K Eberhardt, et al. 1999. "Preliminary Core Set of Domains and Reporting Requirements for Longitudinal Observational Studies in Rheumatology." *The Journal of Rheumatology* 26 (2): 484–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9972992>.
- Wolfe, F, D M Mitchell, J T Sibley, J F Fries, D A Bloch, C A Williams, P W Spitz, M Haga, S M Kleinheksel, and M A Cathey. 1994. "The Mortality of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 37 (4): 481–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147925>.
- Wolfe, F, and T Pincus. 1999. "Listening to the Patient: A Practical Guide to Self-Report Questionnaires in Clinical Care." *Arthritis and Rheumatism* 42 (9): 1797–1808. doi:10.1002/1529-0131(199909)42:9<1797::AID-ANR2>3.0.CO;2-Q.
- Wolfsberg, T G, J McEntyre, and G D Schuler. 2001. "Guide to the Draft Human Genome." *Nature* 409 (6822): 824–26. doi:10.1038/35057000.
- Xiao, H, J Xu, X Zhou, and J Stankovich. 2009. "Associations between the Genetic Polymorphisms of MTHFR and Outcomes of Methotrexate Treatment in Rheumatoid Arthritis." *Clinical and ...* 28 (5): 728–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863444>.
- Yanagimachi, Masakatsu, Takuya Naruto, Takuma Hara, Masako Kikuchi, Ryoki Hara, Takako Miyamae, Tomoyuki Imagawa, et al. 2011. "Influence of Polymorphisms within the Methotrexate Pathway Genes on the Toxicity and Efficacy of Methotrexate in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis." *British Journal of Clinical Pharmacology* 71 (2): 237–43. doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03814.x.
- Zervou, Maria I, Prodromos Sidiropoulos, Eleni Petraki, Vassilios Vazgiourakis, Eleni Krasoudaki, Amalia Raptopoulou, Herakles Kritikos, Eva Choustoulaki, Dimitrios T Boumpas, and George N Goulielmos. 2008. "Association of a TRAF1 and a STAT4 Gene Polymorphism

with Increased Risk for Rheumatoid Arthritis in a Genetically Homogeneous Population.”
Human Immunology 69 (9): 567–71. doi:10.1016/j.humimm.2008.06.006.

ANEXOS

Anexo 1. Efectos adversos y definiciones

Efectos adversos	Definición
Hepatotoxicidad	Valores de alanina aminotransferasa <3 veces el límite superior de los niveles normales, en ausencia de: elevación anterior enzima, fármacos hepatotóxicos concomitantes, marcadores de hepatitis virales positivos y, el consumo de alcohol.
Enfermedad hepática	Valores de alanina aminotransferasa ≥ 3 veces el límite superior de los niveles normales.
Molestias gastrointestinales	Náuseas, anorexia, vómitos, dolor abdominal.
Úlceras en mucosa	Pérdida de la capa mucosa dentro de la cavidad oral.
Nodulosis	Proceso inflamatorio cutáneo y/o subcutáneo que se desarrolla en asociación con la artritis reumatoide.
Infecciones respiratorias	Infección severa o leve dependiendo de la necesidad del tratamiento por vía intravenosa.
Otras infecciones	Otras infecciones incluyendo la infección del tracto urinario inferior.
Alopecia	Pérdida de cabello de la cabeza.
Enfermedad pulmonar	Disnea (con o sin tos seca, fiebre o malestar) asociado con nueva imagen de rayos X compatible con neumonitis intersticial en ausencia de cualquier etiología infecciosa demostrable.
Leucopenia	Leucopenia leve: $4,0 - 2,0 \times 10^9 / L$, moderada: $2,0$ a $0,5 \times 10^9 / L$ y severa $<0,5 \times 10^9 / L$.
Cáncer de órgano sólido	Tumor sólido que crece como una masa de células, en particular, órgano, tejido o glándula.

Anexo 2. Polimorfismos de los genes implicados en la vía metabólica del ácido fólico, el transporte celular del MTX y en su poliglutamación seleccionados para el estudio.

Gen (localización)	refSNP	Cambio	Región
<i>DHFR</i> (5q11.2-q13.2)	rs408626	A>G	5'-UTR
	rs1650697	G>A	Exón 1 (5'-UTR)
	rs70991108	19pb ins/del	Intrón 1
	rs1643650	T>C	Intrón 3
<i>TYMS</i> (18p11.32)	rs45445694	VNTR 28 bp	5'-UTR
	rs183205964	C>G nt12 VNTR	5'-UTR
	rs2847153	G>A	Intrón 2
	rs2847150	G>A	Intrón 3
	rs2847149	G>A	Intrón 3
	rs16948305	C>T	Intrón 3
<i>MTHFR</i> (1p36.3)	rs13306561	A>G	Intrón 1
	rs9651118	T>C	Intrón 2
	rs11121832	C>T	Intrón4
	rs4846052	C>T	Intrón 4
	rs17421511	G>A	Intrón 4
	rs1801133	C>T	Exón 5 (p.Ala222Val)
	rs1801131	A>C	Exón 8 (p.Glu429Ala)
	rs1476413	C>T	Intrón 1
<i>ATIC</i> (2q35)	rs10197559	C>T	Intrón 4
	rs16853782	A>G	Intrón 4
	rs2372536	C>G	Exón 5 (p.Thr116Ser)
	rs12995526	T>C	Intrón 8 0.46
	rs7586969	A>G	Intrón 12

	rs2177735	A>G	Intrón 12
	rs16853826	G>A	Intrón 12
CCND1 (11q13)	rs9344	G>A	Exón 4 (p.Pro241Pro)
	rs649392	A>G	Intrón 4
SLC19A1 (21q22.3)	rs1051266	A>G	Exón 2
	rs4818789	C>A	Intrón 4
	rs2838957	T>C	Intrón 4
ABCB1 (7q21.1)	rs10267099	C>T	Intrón 1
	rs13233308	G>A	Intrón 1
	rs1858923	T>C	Intrón 4
	rs17327624	C>A	Intrón 4
	rs1202181	C>T	Intrón 4
	rs1202184	G>A	Intrón 5
	rs10280623	A>G	Intrón 5
	rs10264990	G>A	Intrón 5
	rs4148734	C>T	Intrón 8
	rs1202170	G>A	Intrón 8
	rs868755	A>C	Intrón 9
	rs6961419	A>G	Intrón 18
	rs11983225	A>G	Intrón 21
	rs4437575	T>C	Intrón 26
	rs1045642	T>C	Exón 27
	rs3842	A>G	Exón 29 (3'UTR)
GGH (8q12.3)	rs1800909	T>C	Exón 1
	rs11545077	G>A	Exón 1
	rs13248452	C>T	Intrón 2
	rs3780130	A>T	Intrón 3
	rs7010484	G>A	Intrón 5
	rs11995525	G>A	Intrón 7
FPGS (9q34.11)	rs10987742	C>T	Intrón 1
	rs10760502	A>G	Exón 1

	rs10106	T>C	Exón 15 (3'UTR)
--	---------	-----	-----------------