



Revista Colombiana de REUMATOLOGÍA

www.elsevier.es/rcreuma



Artículo de revisión

Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide. Revisión sistemática



Luisa F. Restrepo^a, Rodrigo Giraldo^b, John Londoño^b, Carlos Pinzón^c,
Ani Cortes^b, Giovanni Ballesteros^d y Ana María Santos^{b,*}

^a Departamento de Farmacología Clínica, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

^b Departamento de Reumatología, Universidad de La Sabana- Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

^c Departamento de Investigación Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

^d Servicio de Reumatología, Universidad Militar Nueva Granada-Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 11 de febrero de 2015

Aceptado el 3 de febrero de 2016

On-line el 22 de marzo de 2016

Palabras clave:

Metotrexato

Artritis reumatoide

Polimorfismo

Farmacogenética

R E S U M E N

Antecedentes: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria de origen autoinmune, caracterizada por inflamación de múltiples articulaciones que lleva a destrucción del cartílago y del hueso yuxta articular, con el tiempo genera deformidad, discapacidad y deterioro de la calidad de vida. El metotrexato (MTX), reporta un índice de respuesta del 33 al 65%, esta variabilidad puede ser explicada por las variaciones genéticas (polimorfismos) en la ruta metabólica de este fármaco.

Objetivo: Evaluar las posibles asociaciones entre los polimorfismos de la ruta metabólica del MTX y su respuesta en pacientes con AR.

Metodología: Revisión sistemática de la literatura cualitativa (integrative review). Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura, 29 estudios fueron incluidos por texto completo y por calidad metodológica para alcanzar el objetivo del estudio, estos estudios evaluaron polimorfismos en la ruta metabólica del MTX.

Resultados: De los 29 estudios, cinco fueron revisiones sistemáticas o metaanálisis, tres ensayos clínicos de los cuales ninguno fue triple ciego y solo uno fue doble ciego, seis fueron cohortes, siete fueron casos y controles y ocho de corte transversal. Se identificaron los polimorfismos de metiltetrahidofolato reductasa, dihidrofolato reductasa, timidilato sintetasa, 5-aminoimidazol-4- carboxamida ribonucleótido formiltransferasa (AICAR formiltransferasa), 5-aminoimidazol-4- carboxamida ribonucleótido formiltransferasa/IMP ciclohidrolasa (ATIC), transportadores de casete unidos a ATP (ABC ATP-binding cassette), folilglutamato sintetasa, glutamil hidrolasa, transportador de folato reducido (RFC-SLC10A1). Los polimorfismos metiltetrahidofolato reductasa y dihidrofolato reductasa demostraron estar asociados con un aumento en la toxicidad del MTX; los polimorfismos RFC y C677 T están asociados a una mejor eficacia del MTX.

Conclusiones: Los polimorfismos de metiltetrahidofolato reductasa C677 T y RFC1 - G80A generan aumento de eficacia y toxicidad en pacientes tratados con MTX. Sin embargo,

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ana.santos@unisabana.edu.co (A.M. Santos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.02.002>

0121-8123/© 2016 Asociación Colombiana de Reumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

para los demás polimorfismos, aunque los estudios muestran asociaciones estadísticamente significativas, no son concluyentes y algunos son contradictorios. Lo anterior justifica la realización de estudios de carácter multicéntrico, para evaluar la presencia y asociación, con la eficacia o toxicidad en los pacientes con artritis reumatoide tratados con MTX.

© 2016 Asociación Colombiana de Reumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Pharmacogenetics of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review

A B S T R A C T

Keywords:

Methotrexate
Rheumatoid arthritis
Polymorphism
Pharmacogenetics

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease characterised by inflammation of multiple joints, leading to destruction of cartilage and juxta articular bone. It eventually leads to deformity, disability, and impaired quality of life. Methotrexate (MTX), has a reported response rate of 33 to 65%, and this variability may be explained by genetic variations (polymorphisms) in the metabolic pathway of this drug.

To evaluate possible relationships between polymorphisms in the metabolic pathway and response to MTX in patients with RA.

Methodology: A systematic search and review of the literature was conducted. A total of 29 studies that evaluated polymorphisms in the metabolic pathway of MTX were included, due to their full text and methodological quality.

Results: Of the 29 studies, five were systematic reviews and/or meta-analyses, three of which clinical trials none was triple blind and only one was double-blind, six were cohort, seven were case-control, and eight cross sectional. The polymorphism identified were: methylene tetrahydrofolate reductase, dihydrofolate reductase, thymidylate synthase, 5-aminoimidazole-4- carboxamide ribonucleotide formyl transferase (AICAR formyltransferase), 5-aminoimidazole-4- carboxamide polymorphisms formyltransferase/IMP cyclohydrolase ribonucleotide (ATIC) identified conveyors attached to ATP cassette (ABC ATP-binding cassette), foyllypoly-glutamate, glutamyl hydrolase, reduced folate carrier (RFC-SLC10A1). The dihydrofolate reductase and methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism were shown to be associated with increased MTX toxicity. RFC and C677 T polymorphisms are associated with better efficacy of MTX.

Conclusions: The polymorphisms of methylene tetrahydrofolate reductase, C677 T and RFC1 - G80A generate increased efficacy and toxicity in patients treated with MTX. However, for the other polymorphisms, although studies show statistically significant associations, they are not conclusive and some are contradictory. This justifies conducting multicentre studies to assess the presence and association with the effectiveness or toxicity in patients with RA treated with MTX.

© 2016 Asociación Colombiana de Reumatología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de origen autoinmune, caracterizada por la inflamación de múltiples articulaciones. Con el tiempo lleva a grados variables de destrucción del cartilago articular y del hueso yuxta articular, generando deformidad progresiva y con ello discapacidad, alteración de la calidad de vida y disminución de la expectativa de vida¹. En el tratamiento se incluyen los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), medicamentos modificadores de la artritis reumatoide (DMARD) sintéticos y biológicos, analgésicos y medidas no farmacológicas que buscan aliviar el dolor, disminuir el daño y preservar la función articular².

Los DMARD son por definición medicamentos asociados a la reducción del daño articular y óseo causado por la enfermedad. Dentro de los DMARD, el más utilizado ha sido el metotrexato (MTX). Este medicamento fue descubierto en 1948 e indicado inicialmente para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. En 1951, se usó por primera vez para el tratamiento de la artritis psoriásica. En 1980 comenzó su utilización para el tratamiento de AR, mostrando buena respuesta y un perfil adecuado de seguridad. A partir de los años 90, el MTX se convirtió en el DMARD de primera elección^{3,4}. Un porcentaje importante de pacientes no responden clínicamente al tratamiento. Por el resultado limitado de la monoterapia con este fármaco, se utilizan las combinaciones del MTX con otros DMARD tradicionales para incrementar el porcentaje de respuesta en el tratamiento de la AR⁵.

El MTX es un análogo de ácido fólico, diseñado originalmente para inhibir la actividad de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), encargada de convertir dihidrofolatos a tetrahidrofolatos, implicados en la transferencia de un átomo de carbono en las vías metabólicas intracelulares, tales como la síntesis de novo de purinas, pirimidinas y poliaminas, como también la transmetilación de fosfolípidos y proteínas. El MTX tiene adicionalmente propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias.

En cuanto a la actividad inmunosupresora, inhibe la proliferación de linfocitos CD3 - CD4 y otras células inmunocompetentes como los monocitos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares. El MTX también modula citocinas como interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), interferón alfa y la interleucina 2 (IL-2), generando así acciones antiinflamatorias e inmunorreguladoras.

Una vez dentro de la célula, los poliglutamatos de MTX se unen de forma competitiva y con mayor afinidad que la dihidrofolato, a varias enzimas e inhiben su función: DHFR, TYMS y AICAR formiltransferasa⁶. Al inhibir la AICAR formiltransferasa, se genera acumulación intracelular de AICAR, que conduce a mayor liberación de adenosina en la sangre. Este mediador activa receptores extracelulares A2a, A2b y A3 en los monocitos y los macrófagos, inhibe la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-6 e IL-8, promueve la transcripción de ARNm para el receptor antagonista de IL-1 y aumenta la secreción IL-10, potente antiinflamatorio⁷. La activación de los receptores de adenosina sobre las células endoteliales humanas inhibe la producción de IL-6 e IL-8 y disminuye la expresión de E-selectina en la superficie celular. Lo anterior explica el importante papel de la adenosina en la respuesta antiinflamatoria^{8,9}.

El MTX entra a la célula a través del transportador de folato RFC1-SLC19A1. La salida del fármaco desde la célula está controlada por los miembros de la familia de transportadores de casete unidos a ATP (ABC ATP-binding cassette), predominantemente ABCC1 y ABCG2, también conocidos como proteínas resistentes a múltiples fármacos¹⁰. Dentro de la célula, por acción de la enzima folilglutamato sintetasa (FPGS), el MTX se convierte en formas de poliglutamato conocidas como MTXPG, este proceso puede ser revertido por la enzima γ glutamil hidrolasa (GGH). Los MTXPG inhiben la DHFR, enzima que reduce la dihidrofolato a tetrahidrofolato. La conversión de tetrahidrofolato en una forma de 5-metil, ocurre gracias a la metionina sintasa, e implica la síntesis de un metabolito intermedio denominado 5,10-metil-tetrahidrofolato (por la enzima serina hidroximetiltransferasa (SHMT1). El producto resultante 5 metil tetrahidrofolato es una fracción biológicamente importante ya que actúa como donador de un carbón en reacciones celulares como la conversión de homocisteína a metionina⁴.

Además de la inhibición de la vía del folato, los MTXPGs también influyen en la síntesis de novo de las pirimidinas mediante la inhibición de la TYMS, que convierte desoxiuridilato en deoxitimidilato. Los MTXPGs inhiben la enzima AICAR transformilasa, también conocida como proteína bifuncional de biosíntesis de purina (PURH), codificada por ATIC, que conduce a la acumulación intracelular del ribonucleótido adenosina carboxamida aminoimidazol. Este producto

y sus metabolitos inhiben dos enzimas importantes en el metabolismo de la adenosina, la adenosina desaminasa y AMP deaminasa, causando acumulación intracelular de los nucleótidos de adenosina, que al desfosforilarse, generan acumulación de adenosina extracelular, potente agente antiinflamatorio¹¹.

Se han descrito tres rutas metabólicas del MTX; la primera en la que el fármaco es sintetizado por las bacterias intestinales en ácido 4-amino-desoxi-N10-metil. Este metabolito representa menos del 5% de la dosis administrada y es rara su detección en plasma o en orina. La segunda ruta metabólica ocurre en el hígado, donde se convierte a 7 hidroxil MTX¹², considerado un inhibidor de la dihidrofolato reductasa, 10 veces menos potente que los poliglutamatos de MTX. La tercera y más importante de las rutas metabólicas, es la conversión intracelular de MTX a poliglutamatos. En esta última ruta se concentra su mecanismo de acción¹³. Dentro de las células que más convierten el MTX a derivados poliglutamílicos (forma en la que se almacena) se encuentran: los eritrocitos, fibroblastos, precursores mieloides en la médula ósea, queratinocitos, membrana sinovial, hueso cortical y hueso trabecular. De allí se deriva su efecto farmacológico sobre la disminución de población de linfocitos y los eventos adversos a nivel gastrointestinal, piel y mucosas¹⁴ (fig. 1).

Los eventos adversos derivados del MTX, se relacionan con la cantidad y frecuencia de la dosis administrada. La mayoría de estos eventos se pueden detectar de forma temprana y son reversibles. Los mismos se pueden dividir de acuerdo con el sistema afectado en: gastrointestinales como vómito, diarrea o estomatitis que pueden llevar a deshidratación. Hematológicos como depresión de la médula ósea con anemia aplásica, pancitopenia, leucopenia, neutropenia o trombocitopenia. Hepático/biliar/pancreático: hepatotoxicidad aguda y crónica. Aguda, con elevación de las enzimas hepáticas, generalmente transitoria y asintomática. La toxicidad crónica es potencialmente mortal; después de uso prolongado, anomalías persistentes en las pruebas de función hepática pueden preceder la aparición de cirrosis.

Variabilidad en la respuesta al MTX. A pesar de ser el DMARD más utilizado debido a su eficacia y seguridad a largo plazo, su respuesta tiene gran variabilidad entre los pacientes. Esto se atribuye a diferentes factores como: el sexo, la edad, la duración de la enfermedad, la proteína C reactiva, los niveles de factor reumatoide y las variaciones genéticas. Entre ellos, los factores genéticos se consideran de gran importancia y por esto se han estudiado, apoyándose de la farmacogenética para la búsqueda y el análisis de las variaciones genéticas del individuo (polimorfismos) asociados a la eficacia y seguridad terapéutica al tratamiento con MTX¹⁵⁻¹⁸.

En la ruta metabólica de este medicamento se pueden encontrar diversos polimorfismos que afectan la respuesta y toxicidad (fig. 2). ABCs, SLC10A1. ABC (ABC ATP-binding cassette) y RFC (transportador de folato reducido), en especial SLC19A1/RFC1, son transportadores del MTX que influyen en su absorción celular y en el flujo de salida¹⁹.

-Polimorfismos en enzimas que intervienen en la poliglutamación del MTX: FPGS y GGH. La cantidad de poliglutamatos MTX intracelular depende de la tasa de poliglutamación, que está

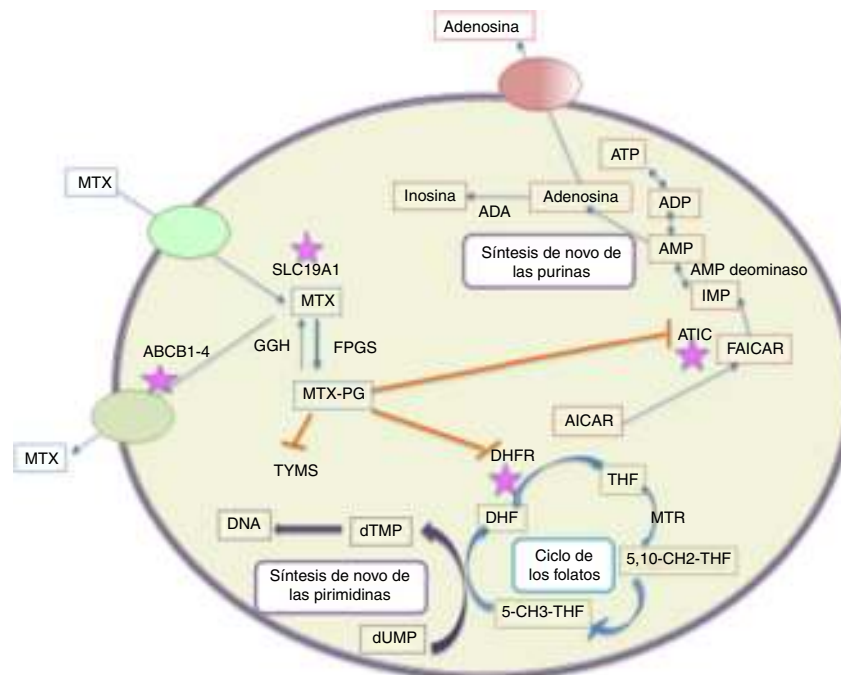


Figura 1 – Rutas metabólicas del metabolismo intracelular el MTX. MTX entra activamente a las células a través de la SLC19A1, mientras el flujo de salida se realiza a través de la membrana celular mediada por varios transportadores (ABC 1-4). Una vez dentro de la célula se realiza la poliglutaminación (MTX-PG) mediante la enzima FPGS, reacción revertida por la GGH. MTXPG inhibe varias enzimas importantes en el metabolismo del folato, tales como dihidrofolato reductasa (DHFR), que resulta en el agotamiento del tetrahidrofolato (THF) (precursor del cofactor folato 5 - CH3- THF). La inhibición de TYMS por MTX-PG, e indirectamente a través de agotamiento de THF, conduce a la inhibición de la biosíntesis de pirimidina. La disminución en la síntesis de los compuestos de folato también conduce a la inhibición de la biosíntesis de las purinas. MTX-PG inhibe ATIC, causando la acumulación intracelular de AICAR, conduciendo eventualmente a la generación de adenosina. Los asteriscos indican las proteínas en las cuales los polimorfismos se han visto más asociados a las alteraciones en la respuesta al metotrexato en diferentes poblaciones.

ABCB1-4: trasportadores de ABC de ATP del 1 al 4; ADA: adenosina deaminasa; AICAR: ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida; AMPD: monofosfato de adenosina desaminasa; ATIC: bifuncional proteína biosíntesis de purina; 5 - CH3-THF: 5 -metil tetrahidrofolato; 5,10- CH2-THF: 5,10-metil tetrahidrofolato de metil; DHF: dihidrofolato; DHFR: dihidrofolato reductasa; dTMP, desoxitimidina monofosfato; FAICAR: 10 -formil- 5 - aminoimidazol - 4 - carboxamida; FPGS: sintetasa folilpoliglutamato; GGH: gama-glutamil hidrolasa; IMP: inosina - 5 - monofosfato; MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa; MTR: tetrahidrofolato reductasa metilo; MTRR: metionina sintasa reductasa; MTX: MTX; MTX-PG: poliglutamato de MTX; SLC19A1, portador de soluto 19A1; THF: tetrahidrofolato; TYMS: timidilato sintasa.

determinada por las actividades de las enzimas FPGS y GGH. Los PMF en estas enzimas pueden generar cambios en eficacia o toxicidad.

DHFR. La dihidrofolato reductasa es uno de los objetivos terapéuticos del MTX. Los polimorfismos que resaltan son rs12517451, rs10072026 y rs1643657 por una mayor asociación con eventos adversos; el SNP DHFR 317AG (rs70991108) se asocia con mayor respuesta al MTX, y los pacientes con genotipo 317AA con menor respuesta^{20,21}.

TYMS. Esta enzima, necesaria para la síntesis de novo de timidilato, se inhibe directamente por MTXPG. Los PMF en el gen que codifica esta enzima incluye repetición en tándem (dos o tres repeticiones de una unidad de 28 pb) en la región potenciadora en el 5'-UTR. Los pacientes homocigotos para la triple (3R) repetición de alelo de TYMS, presentan aumento en la expresión ARNm TYMS y mayor actividad enzimática en comparación con aquellos con el alelo 2R²².

ATIC. Es un gen importante en la vía de adenosina; este gen codifica la enzima implicada en la liberación de adenosina extracelular que tiene propiedades antiinflamatorias²³.

Polimorfismos en el MTHFR. Es de los polimorfismos más ampliamente estudiados y juega un papel importante en la respuesta al tratamiento ya que afecta la actividad enzimática y el metabolismo del MTX, dentro de estos PMF se encuentran; C677 T (rs1801133) y A1298 C (rs1801131)^{24,25}.

Materiales y métodos

Se realizó una revisión sistemática cualitativa (integrative review) de la literatura de estudios experimentales (ensayos clínicos aleatorizados, ensayos clínicos), estudios observacionales analíticos (cohortes casos y controles) y de corte transversal con el fin de evaluar el efecto de los polimorfismos

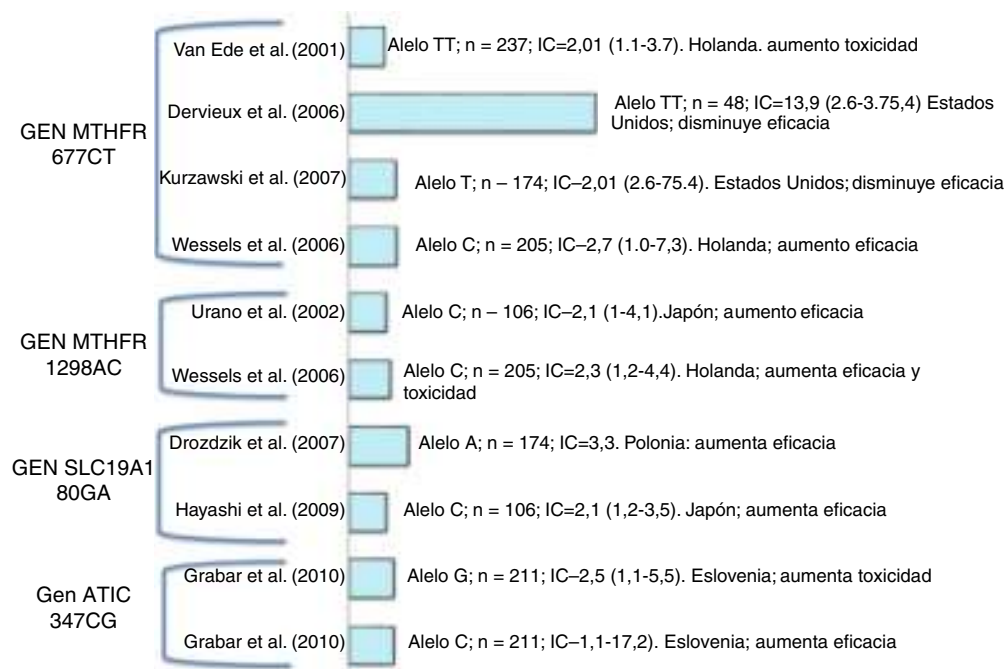


Figura 2 – Polimorfismos asociados con eficacia y toxicidad del MTX.

MTHFR, ATIC, DHFR, ATYM, FPGS, GGH SLC10A1 y ABC sobre la efectividad y seguridad terapéutica del MTX en el manejo de la AR. Se realizó una búsqueda de estudios primarios, revisiones sistemáticas y metaanálisis en las más importantes bases de datos científicas utilizando términos MeSH y términos *all fields* para cada uno de los componentes de la pregunta PICOT (*población, intervención, control, desenlace y tipo de estudio*).

Tipo de estudios

Fueron incluidos ensayos clínicos controlados aleatorizados, estudios de cohorte, casos y controles y de corte transversal publicados y no publicados, que estudian la relación entre la presencia de polimorfismos genéticos y la efectividad clínica del MTX en el manejo de la AR. En todos los casos el número de pacientes estudiados fue mayor de 10. Para los estudios experimentales se tuvieron en cuenta los estudios que contemplaron la aleatorización. En los estudios analíticos se incluyeron todos los que contemplaban la exposición, la población objeto y estrategias de control de sesgos.

Tipo de participantes

Adultos (edad mayor de 18 años) con diagnóstico de AR y tratamiento con MTX.

Tipo de intervención

Polimorfismos en MTHFR, ATIC, DHFR, ATYM, FPGS, GGH, SLC10A1 y ABC.

Tipo de desenlaces

Eficacia del MTX en la progresión de la enfermedad mediante criterios de respuesta ACR 20%. Seguridad del MTX estimando

el número de efectos adversos en términos de frecuencia y severidad de dichos eventos.

Búsqueda electrónica

Para identificar los estudios a incluir en esta revisión, se realizó una búsqueda en las bases de datos utilizando la misma estrategia. La búsqueda contempló una combinación de palabras clave y los filtros recomendados de PubMed Central. Se realizó búsqueda manual en referencias relacionadas y autores clave. Se limitó la búsqueda a los idiomas inglés y español.

Términos de búsqueda

Filtro: («arthritis, rheumatoid» [MeSH Terms] OR («arthritis» [All Fields] AND «rheumatoid» [All Fields]) OR «rheumatoid arthritis» [All Fields] OR («rheumatoid» [All Fields] AND «arthritis» [All Fields])) AND («pharmacogenetics» [MeSH Terms] OR «pharmacogenetics» [All Fields]) AND («methotrexate» [MeSH Terms] OR «methotrexate» [All Fields]) AND («Polymorphism») [MeSH Terms].

Bases de datos

- Cochrane Library.
- Cochrane Controlled Trials Register: Cochrane Library.
- ScienceCitationIndex (1981 - 2015).
- MEDLINE (1966-2015).
- CINAHL (1982-2015).
- SIGLE (1980-2015).
- LILACS (1982-2015).
- Scielo (2005-2015).
- Center of Reviews and Dissemination of United Kindom.
- Clinical Trials.gov.

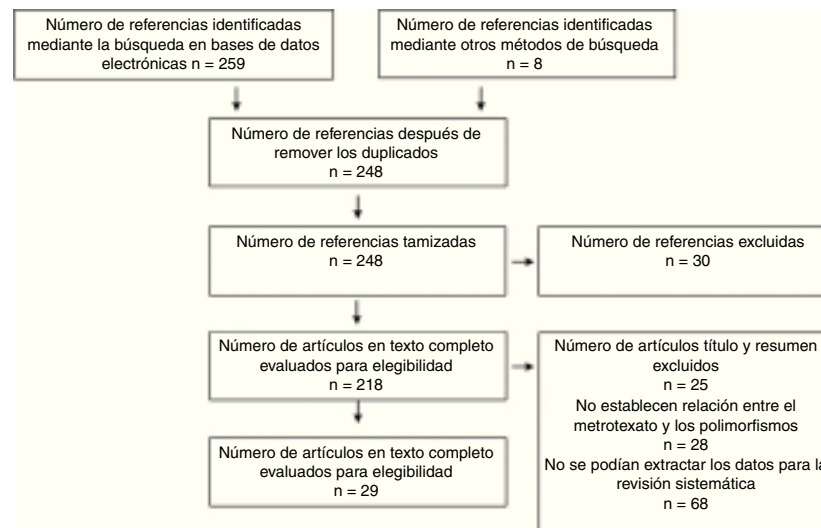


Figura 3 – Diagrama de flujo para la tamización y selección de evidencia. Estudios primarios.

Selección de los estudios

Los resúmenes de los artículos encontrados en la búsqueda se revisaron para eliminar los artículos irrelevantes. Posteriormente los artículos relevantes fueron revisados por tres personas independientes para verificar que cumplieran los criterios de inclusión. Las diferencias fueron resueltas por consenso.

Extracción de los datos

Los estudios que cumplieron los criterios de inclusión fueron analizados para la extracción de datos. Los datos fueron extraídos independientemente por dos personas (reumatólogo y farmacólogo clínico) expertos en metodología y los resultados fueron reevaluados (epidemiólogo clínico-PhD) para ver la consistencia basados en el formato de recolección de datos diseñado y validado para tal fin. Los datos que se incluyeron fueron: número de pacientes, población, edad, sexo, dosis de MTX, polimorfismo evaluado, desenlace (eficacia-toxicidad), el número de eventos, medidas de frecuencia y asociación, intervalos de confianza y significación estadística.

Medidas del efecto

No se realizó análisis tipo metaanálisis debido a la alta heterogeneidad en los estudios. Por lo tanto se decidió realizar un análisis narrativo de los resultados de los estudios. Los datos fueron recolectados en una tabla de evidencia.

Datos faltantes

Algunos estudios no reportaron medidas de frecuencia o asociación, por lo que se tomó la significación estadística y se comparó con los resultados directos del estudio.

Sesgo de publicación

Se realizó búsqueda de la literatura en todas las bases de datos relevantes de manera exhaustiva. Se buscó de manera manual

información local en la Revista Colombiana de Reumatología, Memorias de la red «Global Arthritis Research Network y del Meeting and Bio-Rheumatology International Congress.

Resultados

Fueron identificadas con los términos de búsqueda, un total de 267 referencias. De ellas 215 fueron excluidas después de aplicar los criterios de elegibilidad de sus títulos o resúmenes, con la exclusión de los duplicados. De los 52 estudios restantes, 23 fueron descartados por falta de un grupo control, de aleatorización, claridad en el método de evaluación de los resultados. Finalmente se incluyeron un total de 29 estudios. Todos los estudios elegibles fueron en idioma inglés (figs. 3 y 4).

De los 29 estudios, cinco fueron revisiones sistemáticas o metaanálisis, tres ensayos clínicos de los cuales ninguno fue triple ciego y solo uno fue doble ciego, seis fueron cohortes, siete fueron casos y controles y ocho de corte transversal (tablas 1 y 2).

Polimorfismo ABCB1

Tres estudios evaluaron la presencia del polimorfismo ABCB1, dos estudios de cohorte y un estudio de casos y controles. Los estudios de Plaza et al., 2012 y Kooloos et al., 2010, evidencian una asociación clara entre la presencia del polimorfismo ABCB1 y el aumento de la toxicidad por el MTX con OR 2,39 IC95% (1,07-5,28) y OR 2,6 IC95% (1,1-6,2) respectivamente^{24,26}. El estudio de casos y controles publicado por Takatori et al., 2006, también reportó una asociación, estadísticamente significativa entre la presencia del polimorfismo y el aumento de la toxicidad del MTX, OR 8,78 IC95% (1,13-68,5)²⁷.

Polimorfismo MTHFR

Doce estudios fueron identificados para la evaluación del polimorfismo MTHFR. Los diseños de estudio fueron 2 estudios de

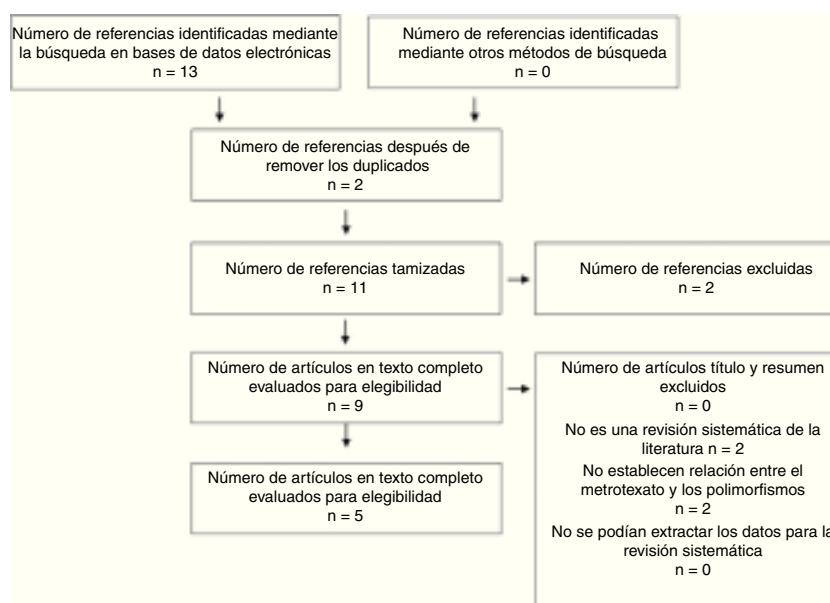


Figura 4 – Diagrama de flujo para la tamización y selección de evidencia. Revisiones sistemáticas y metaanálisis.

cohorte, 3 estudios de casos y controles, 5 estudios de corte transversal y 2 ensayos clínicos controlados.

Estudios de cohorte. En los estudios de cohorte se estableció una relación entre el polimorfismo y la disminución de la efectividad del MTX, el estudio de Plaza et al.²⁶, 2012 estableció que presenta una asociación de riesgo de toxicidad con el MTX, OR 3,21 IC95% (1,45–7,10), en el estudio de Urano et al.²⁸, 2002 se estableció una relación para la disminución de la efectividad del MTX para el control de la enfermedad, OR 2,18 IC 95% (1,17–4,06). En los estudios de casos y controles la asociación no es consistente. En el estudio publicado por Mena et al.²⁹, 2001 se estableció la relación entre la presencia del polimorfismo de MTHFR y el aumento de toxicidad del MTX para todos los alelos evaluados C677 T y A1298 C, sin embargo solo para el alelo A1298 C esta relación fue estadísticamente significativa para el aumento de la toxicidad con el MTX, OR 2,75 IC95% (1,11–6,75). Los estudios de Aggarwal et al.³⁰, 2006 y Pawik et al.³¹, 2007 no pudieron establecer una clara asociación entre la presencia del polimorfismo y el comportamiento terapéutico del MTX.

En los estudios de corte transversal la evidencia no es consistente. Los estudios de Weisman et al.³², 2006, Kim et al.³³, 2006, y Tanigushi et al.³⁴, 2007 reportaron para el polimorfismo con el alelo C677 T, una asociación con el aumento de toxicidad del MTX, OR 3,3 IC95% (1,72–6,45); OR 3,8 IC95% (2,29–6,33) y OR 2,4 IC95% (1,29–4,55) respectivamente. El estudio de Berkun et al.³⁵, 2004 reportó una relación estadísticamente significativa entre la presencia de este polimorfismo y la disminución en el número de eventos adversos, OR 5,24 IC95% (1,38–20) (tabla 1). Dos ensayos clínicos controlados reportaron la asociación entre la presencia del polimorfismo con el gen C677 T para dos desenlaces opuestos. El estudio de van Ede et al.³⁶, 2001 estableció una asociación de riesgo entre la presencia del polimorfismo y el aumento de toxicidad con MTX, OR 2,27 IC95% (1,06–5,34) y el estudio de Wessels et al.³⁷, 2006 que estableció una asociación con mejora de la eficacia del MTX en individuos con presencia de este polimorfismo, OR 2,23 IC95% (1,18–4,41).

Polimorfismo SLC19A1

Solo un estudio de cohorte, que evaluara la asociación de este polimorfismo y el comportamiento del MTX, se incluyó en esta revisión sistemática. El estudio de Grabar et al.³⁸, 2012 estableció que la presencia de este polimorfismo disminuye la toxicidad por MTX, OR 0,33 IC95% (0,16–0,68).

Polimorfismo RFC

Cinco estudios evaluaron la presencia de este polimorfismo y el comportamiento terapéutico del MTX. Un estudio de cohorte, dos estudios de casos y controles y dos estudios de corte transversal fueron incluidos en esta revisión sistemática para la evaluación de este polimorfismo. En el estudio de cohorte realizado por Hayashi et al.³⁹, 2009 se evidenció una asociación entre la disminución de la eficacia del MTX y la presencia de este polimorfismo; el mismo autor publicó en el año 2013 un estudio de casos y controles donde evaluaron la asociación entre la presencia del polimorfismo RFC1 y la efectividad del MTX el cual evidenció que esta asociación disminuye la efectividad del MTX, OR 2,27 IC95% (1,35–3,84). Otro estudio de casos y controles, publicado por Takatori et al.²⁷, 2006, no estableció relación entre la presencia de este polimorfismo y la efectividad del MTX y toxicidad. En dos estudios de corte transversal, Dervieux et al.⁴⁰, 2004 y Drozdik et al.⁴¹, 2007 establecieron una asociación entre la presencia del polimorfismo y el aumento de la eficacia del MTX, OR 4,8 IC95% (1,8–13) y OR 3,32 IC95% (1,26–8,79) respectivamente.

Otros polimorfismos

Los polimorfismos GGH, ATIC, TSER han sido explorados por diferentes autores, en esta revisión el estudio de Dervieux et al.⁴⁰, 2004 establece que la presencia del polimorfismo GGH aumenta la eficacia del MTX, OR 3,4 IC95% (1,4–8,4). Owen et al.^{20,42}, 2013 encontraron una asociación entre la presencia del

Tabla 1 – Estudios de cohorte															
Autor/año	País	Población	Tipo de estudio	Dosis de MTX	Polimorfismos evaluados gen variante alelo			Desenlace	# Eventos NR o con EA	# Eventos R o sin EA	OR	IC 95%	p	Conclusiones	
Hayashi H/2009 ³⁹	Japón	87	Cohorte	2,5 a 15 mg/ semanal	RFC	G80A	A	PCR (disminución)	-	-	-	-	0,002	Disminuye eficacia	
Plaza JC/2012 ²⁶	España	54	Cohorte	7,5 a 15 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Toxicidad	-	-	3,21	1,45-7,10	0,005	Aumenta toxicidad	
						A1298 C		Toxicidad	-	-	-	-	0,24		
						ABCB1	C3435 T	C	Toxicidad	-	-	2,39	1,07-5,28	0,046	
Urano W/2002 ²⁸	Japón	106	Cohorte	2,5 a 12,5 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Eficacia menor dosis (PCR-VSG)	-	-	NS	NS	NS	Disminuye eficacia	
						A1298 C	C				2,18	1,17 - 4,06	<0,005		
Grabar PB/2012 ³⁸	Europa	212	Cohorte	7,5 a 12,5 mg/ semanal	SLC19A1	-	-	Toxicidad	-	-	0,33	0,16 - 0,68	0,021	Disminuye toxicidad	
Kooloos W/2010 ²⁴	Holanda	205	Cohorte	7,5 a 25 mg/ semanal	ABCB1	C3435 T	T	Eficacia (DAS28)	-	-	NS	NS	0,004	Aumenta toxicidad	
								Toxicidad			2,6	1,1 - 6,2			
Estudios de casos y controles															
Autor/año	País	Población	Tipo de estudio	Dosis de MTX	Polimorfismos evaluados gen variante alelo			Desenlace	# Eventos NR o con EA	# Eventos R o sin EA	OR	IC 95%	p	Conclusiones	
Mena JP/2011 ²⁹	México	70	Casos y controles	7,5 a 15 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	C	Aumento de transaminasas	-	-	1,1	0,46-2,61	0,821	Aumenta toxicidad	
						A1298 C	A				0,36	0,14-0,89	0,023		
							C				2,5	1,11-6,75	0,023		
Jekic B/2013 ²²	Belgrado	184	Casos y controles	10 a 12,5 mg/ semanal	TYMS	3RG/3RC	3RG/3RC	DAS 28 (disminución)	NR 38	R 146	5,4	1,4-21,1	0,002	Disminuye eficacia	
					GGH	G354 T	GG	Mielosupresión	MS 8	176	—	—	0,003		
Aggarwal P/2006 ³⁰	India	150	Casos y controles	7,5 a 15 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Eficacia (DAS28)	64	-	No diferencias			No relación	
Takatori R/2006 ²⁷	Japón	124	Casos y controles	6 mg/ semanal	ABCB1	C3435 T	C	Eficacia (CA, VSG,PCR)	-	-	8,78	1,13 - 68,5	0,038	Aumenta toxicidad	
						ATIC	C347G	-			NS	NS	NS	No relación	
						RFC1	G80A				NS	NS	NS		
Hayashi H/2013 ⁴³	Japón	170	Casos y controles	2 - 12mg/ semanal	RFC1	G80A	AA	Eficacia	-	-	2,27	1,35 - 3,84	0,0018	Disminuye eficacia	
Pawlik A/2007 ³¹	Polonia	50	Casos y controles	7,5 a 15 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Eficacia	-	-	2,3	0,76 - 7,01	NS	No relación	
						A1298 C	C				1,15	0,45 - 2,91			

Tabla 1 (continuación)															
Estudios de corte transversal															
Autor/año	País	Población	Tipo de estudio	Dosis de MTX	Polimorfismos evaluados gen variante alelo			Desenlace	# Eventos NR o con EA	# Eventos R o sin EA	OR	IC 95%	p	Conclusiones	
Dervieux T/2004 ⁴⁰	EE. UU.	226	Corte transversal	5 a 25 mg/ semanal	RFC	G80A	A	Aumento de concentración de MTX	-	-	4,8	1,8 - 13	0,002	Aumenta eficacia	
Owen SA/2013 ²⁰	UK	309	Corte transversal	5 a 15 mg/ semanal	GGH	C401 T	T	Eficacia	-	-	3,4	1,4 - 8,4	0,007	Aumenta eficacia	
Weisman M/2006 ³²	EE. UU.	214	Corte transversal	7,5 a 15 mg/ semanal	ATIC	C347G	-	Toxicidad	-	-	1,65	1,13 - 2,42	0,01	Disminuye Eficacia	
					MTHFR	C677 T	-		-	-	-	1,86	1,26 - 2,74	0,001	Aumenta toxicidad
					TSER	G347G	-		-	-	-	3,3	1,72 - 6,45	0,01	Aumenta toxicidad
Drozdziak M/2007 ⁴¹	EE. UU.	174	Corte transversal	7,5 a 15 mg/ semanal	SHMT1	C1420 C	AA	Aumento de MTX, eficacia y transaminasas	-	-	5,38	3,05 - 9,49	<0,01	Aumenta eficacia	
Berkun Y/2004 ³⁵	-	93	Corte transversal	7,5 a 15 mg/ semanal	RFC1	G80A	AA	Disminución de eventos adversos	-	-	2,97	1,64 - 5,36	<0,01	Aumenta eficacia	
Kim SK/2006 ³³	Korea	385	Corte transversal	7,5 a 15 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Toxicidad	-	-	2,38	1,19 - 4,77	<0,05	Aumenta toxicidad	
Kurzawski M/2007 ⁴⁴	Polonia	174	Corte transversal	7,5 a 15 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Eficacia	-	-	3,32	1,26 - 8,79	0,021	Aumenta eficacia	
					MTHFR	A1298 C	AA	Toxicidad	-	-	5,24	1,38 - 20	0,03	Disminuye EA y eficacia	
Tanigushi A/2007 ³⁴	Tokio	208	Corte transversal	6 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Aumento de transaminasas	-	-	3,8	2,29 - 6,33	<0,05	Aumenta toxicidad	
					MTHFR	C677 T	T	Eficacia	-	-	2,61	1,35 - 5,04	-	Aumentan la frecuencia de remisión	
					MTHFR	A1298 C	C	Toxicidad	-	-	1,93	1,19 - 3,77	-	Aumenta toxicidad	
Ensayos clinicos controlados															
Autor/año	País	Población	Tipo de estudio	Dosis de MTX	Polimorfismos evaluados gen gariante alelo			Desenlace	# Eventos NR o con EA	# Eventos R o sin EA	OR	IC 95%	p	Conclusiones	
van Ede A/2001 ³⁶	EE. UU.	236	Ensayo clínico	7,5 a 25 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Aumento de transaminasas	-	-	2,27	1,06 - 5,34	-	Aumenta toxicidad	
Wessels J/2006 ³⁷	EE. UU.	247	Ensayo clínico	7,5 a 15 mg/ semanal	MTHFR	C677 T	T	Eficacia	-	-	2,23	1,18 - 4,41	0,014	Aumenta eficacia	
					MTHFR	A1298 C	C	Toxicidad	-	-	2,5	1,32 - 4,72	0,005	Aumenta toxicidad	
Wessels J/2006 ⁴⁵	EE. UU.	247	Ensayo clínico	7,5 a 15 mg/ semanal	AMPD1	C34 T	-	Eficacia (DAS)	-	-	2,1	1 - 4,5	NS	Aumenta eficacia	
					ATIC	C347G	-		-	-	2,5	1,3 - 4,7	<0,05	Aumenta eficacia	
					ITP4	C94A	-		-	-	2,7	1,1 - 8,1	NS		

Tabla 2 – Revisiones sistemáticas y metaanálisis

Autor/año	Tipo de estudio	N.º de estudios	Tipos de estudios primarios	Población	Polimorfismos incluidos	Desenlace	OR	IC	Observaciones
Kung T/ 2014 ⁴⁶	Revisión sistemática metaanálisis	87	Cohorte-transversales	Caucásica	RFC1 - G80A	Eficacia Toxicidad	1,42	1,04 - 1,93	Asociación PMF con aumento de eficacia y toxicidad
Owen SA 2013 ⁴²	Metaanálisis	17	Cohorte	India Israel Corea Japón Polonia Italia Japón México Nueva Zelanda	MTHFR C677 T	Eficacia Toxicidad	1,05 1,38	0,83 - 1,32 0,9 - 2,12	No concluyente
Lee Y 2010 ⁴⁷	Metaanálisis	20	Cohorte-transversales	Japón Israel Países bajos Corea India Asia	MTHFR C677 T MTHFR A1298 C	Eficacia Toxicidad	1,19 0,63 (0,1) 0,94 (0,8)	0,80-1,78 0,325-1,23 0,47-1,85	No concluyente
Spyridopoulou K 2012 ⁴⁸	Revisión sistemática y metaanálisis	44	Cohorte-transversales	Caucásica asiática	MTHFR C677 T	Toxicidad	1,67	1,009-2,76	Asociación PMF con aumento de toxicidad
Fisher M 2009 ⁴⁹	Metaanálisis	8	Cohorte-transversales	-	MTHFR C677 T MTHFR A1298 C	Toxicidad	1,71 (<0,001) 1,12 (0,62)	1,32-2,21 0,79-1,6	Asociación PMF C677 T con aumento de toxicidad

polimorfismo ATIC y la disminución de la efectividad del MTX, OR 1,65 IC 95% 1,13-2,42; otro autor, Weissman et al., 2006, evidenció para el mismo polimorfismo una asociación con el aumento de toxicidad OR 2,97 IC95% (1,64-5,36). Este mismo autor exploró la relación de aumento de la toxicidad del MTX y la presencia del polimorfismo TSER estableciendo un OR de 5,38 IC95% (3,05-9,49)³².

Características poblacionales, polimorfismos y genotipos

El efecto de la variación genética de la ruta metabólica del MTX está dada por polimorfismos en enzimas como la MTHFR, algunos transportadores de MTX a través de la membrana celular y enzimas influyentes de la ruta metabólica. Diferentes SNP han sido ligados a los efectos adversos o a la respuesta terapéutica de este fármaco: C677 T y A1298 C estudiados en poblaciones caucásica y japonesa^{28,50}. Así mismo, polimorfismos relacionados con el transportador de folato reducido RFC1-G80A y ATIC-C347G han sido estudiados en poblaciones caucásica, asiática, africana y mexicana^{10,51}.

Un estudio realizado en población mestiza de México reportó diferentes PMF, encontrándose que el genotipo de riesgo MTHFR C677 T presentó una elevada prevalencia del 33% genotipo TT, el genotipo de riesgo AA MTHFD1 G1958A en los mestizos fue de 34% y para los amerindios de 58%, a diferencia de las poblaciones con ascendencia asiática y africana en donde la frecuencia de AA fue baja (4%), demostrando que existe una distribución geográfica diferencial de las variantes de riesgo en la vía metabólica del folato/homocisteína en relación con el origen étnico^{51,52}.

Han sido descritos polimorfismos de ABC B1, como el C3435 T (rs1045642) que se asocia de forma positiva con la respuesta al tratamiento con MTX para AR y en algunos casos con aumento de la toxicidad. Otro de los PMF es el rs4793665 del ABC C3 con asociación positiva en cuanto a efectividad al tratamiento^{26,53}. En RFC/SLC19A1, los pacientes que portan el alelo G en G80A (rs1051266) tienen una captación intracelular de MTX menor en comparación con los que portan el alelo A, lo cual llevaría a menor eficacia^{17,43}. Un estudio reciente realizado en población portuguesa sugiere mayor toxicidad gastrointestinal temprana en los portadores del alelo G, la cual se reduce significativamente con el suplemento de ácido fólico⁵⁴. En un estudio realizado con población del *Treatment of Early Aggressive Rheumatoid Arthritis* se encontró asociación de variantes en el gen SLC22A2 con una mejor respuesta al MTX⁵⁵.

En pacientes con genotipo AA o AG de FPGS 2572CT (rs1544105) y con AR se ha encontrado pobre respuesta al MTX y en pacientes con genotipo SNP 63942342CT (rs12681874) del GGH, se ha encontrado asociación con mayor eficacia⁵⁶. El genotipo no TT de GGH T16 C (rs1800909) se asoció con mayor riesgo de disfunción hepática y el polimorfismo-354 T GGH-G se relacionó con mayor riesgo de mielosupresión^{20,22}.

En estudios con el gen TYMS se ha encontrado que el genotipo 3G/3G del alelo 3R se asocia con mala respuesta al MTX en pacientes con AR²². En pacientes con el SNP ATIC 26293TC (rs12995526) se encontró asociación con inadecuada respuesta al tratamiento con MTX y las variantes rs3821353, rs7563206 y rs16853834 se han asociado con mayor eficacia²³.

Para el polimorfismo C677 T de la MTHFR se reportaron asociaciones negativas en cuanto a toxicidad^{24,25}. Sin embargo en pacientes con AR con el genotipo CT o TT se ha encontrado mayor riesgo de efectos adversos que aquellos con el genotipo CC⁵⁷, estos estudios han sugerido una asociación entre C677 T y toxicidad del MTX en caucásicos y en asiáticos. No se ha encontrado asociación positiva entre polimorfismo C677 T y la efectividad terapéutica^{58,59}.

En cuanto al PMF A1298 C de MTHFR, hay estudios que reportan asociación con efectividad y toxicidad y otros que no la encuentran significativa. La variante rs1801131 C prevalece en el grupo que responde al MTX, pacientes con genotipos CC o CA tienen mayor respuesta clínica que aquellos con genotipo AA; además, A1298 C se ha asociado con elevación de las transaminasas²⁹.

En las revisiones sistemáticas y metaanálisis (tabla 2) es evidente que el polimorfismo de RFC1 - G80A se asocia con aumento de eficacia y toxicidad y el PMF del gen MTHFR C677 T se asocia con toxicidad en pacientes tratados con MTX.

Discusión y conclusiones

No cabe duda acerca de la importancia del MTX en el tratamiento de los pacientes con AR. Todas las guías publicadas por organismos internacionales coinciden en que debe ser el fármaco de primera línea. Su bajo costo y su buen perfil de seguridad así lo justifican. El MTX es actualmente el medicamento más utilizado en el tratamiento de la AR en todo el mundo⁶⁰ y ha resultado ser más efectivo que otros DMARD⁶¹. Sin embargo, la respuesta terapéutica medida por el constructo ACR 20% es alcanzada en promedio por el 45% de pacientes⁶². El número considerable de pacientes con falla terapéutica se debe a la eficacia limitada y la toxicidad de la monoterapia, representada en efectos adversos frecuentes producto de la variabilidad individual en la respuesta¹⁴. Han sido hasta el momento muchas las variantes genéticas estudiadas y los resultados son contradictorios. La mayoría de los autores coinciden en el potencial de la farmacogenética en reumatología, pero hacen énfasis en que con los datos obtenidos en los diferentes estudios realizados a la fecha, no existe información lo suficientemente robusta para recomendar el uso de alguna de estas pruebas genéticas en la práctica clínica.

Este estudio presenta limitaciones inherentes al diseño. Se presenta posible sesgo de publicación debido a que no se buscó información en bases de datos específicas de reumatología solo memorias de congresos y la Revista Colombiana de Reumatología. Así mismo se limitó la búsqueda solo a los idiomas español e inglés. No se pudo realizar metaanálisis debido al reporte diferencial de los diferentes desenlaces clínicos. Los resultados de esta revisión sistemática se deben realizar con precaución.

En esta revisión es claro que existen dos polimorfismos que los metaanálisis han demostrado aumentar la eficacia y toxicidad del MTX: en el gen RFC1 - G80A y el del gen MTHFR C677 T. Sin embargo, otras variantes genéticas han mostrado asociación en estudios individuales. El estudio de estas variantes es importante en población colombiana para lograr una mejor comprensión de la variabilidad interindividual y racial. El objetivo final para el médico y el paciente será establecer una

terapia personalizada que lleve a una mejor y pronta respuesta en los pacientes con AR con la correspondiente disminución de eventos adversos.

De acuerdo con la revisión, en Colombia y Sudamérica no hay estudios que estimen la prevalencia de estos polimorfismos en pacientes con AR que reciben tratamiento con MTX, más aún teniendo en cuenta la prevalencia y el impacto que esta enfermedad tiene en la población y el sistema de salud^{51,63,64}. Esto hace necesario determinar en la población mestiza colombiana, mezcla del blanco europeo con el negro africano y el indígena precolombino, la presencia de variaciones genéticas que condicionen la respuesta al tratamiento con MTX.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pincus T. Assessment of long-term outcomes of rheumatoid arthritis. How choices of measures and study designs may lead to apparently different conclusions. *Rheum Dis Clin North Am.* 1995;21:619-54.
2. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:492-509.
3. Wolfe F, Cush JJ, O'Dell JR, Kavanaugh A, Kremer JM, Lane NE, et al. Consensus recommendations for the assessment and treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001;28:1423-30.
4. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, de Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum.* 1998;27:277-92.
5. Boers M, Verhoeven AC, Markusse HM, van de Laar MA, Westhovens R, van Denderen JC, et al. Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1997;350:309-18.
6. Edno L, Bressolle F, Gomeni R, Bologna C, Sany J, Combe B. Total and free methotrexate pharmacokinetics in rheumatoid arthritis patients. *The Drug Monit.* 1996;18:128-34.
7. Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am.* 1997;23:739-55.
8. Bressolle F, Kinowski JM, Morel J, Pouly B, Sany J, Combe B. Folic acid alters methotrexate availability in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000;27:2110-4.
9. Lebbe C, Beyeler C, Gerber NJ, Reichen J. Intraindividual variability of the bioavailability of low dose methotrexate after oral administration in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1994;53:475-7.
10. Davila L, Ranganathan P. Pharmacogenetics: implications for therapy in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7:537-50.
11. Ranganathan P. An update on methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2008;9:439-51.
12. Seideman P, Beck O, Eksborg S, Wennberg M. The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy

- metabolite in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 1993;35:409-12.
13. Grim J, Chladek J, Martinkova J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42:139-51.
 14. Treon SP, Chabner BA. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem.* 1996;42:1322-9.
 15. Umicevic Mirkov M, Coenen MJ. Pharmacogenetics of disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: towards personalized medicine. *Pharmacogenomics.* 2013;14:425-44.
 16. Szekanecz Z, Mesko B, Poliska S, Vancsa A, Szamosi S, Vegh E, et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics in rheumatology. *Immunol Res.* 2013;56:325-33.
 17. Zhu H, Deng FY, Mo XB, Qiu YH, Lei SF. Pharmacogenetics and pharmacogenomics for rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate treatment: the 2013 update. *Pharmacogenomics.* 2014;15:551-66.
 18. Romao VC, Lima A, Bernardes M, Canhao H, Fonseca JE. Three decades of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis: can we predict toxicity. *Immunol Res.* 2014;60:289-310.
 19. Blits M, Jansen G, Assaraf YG, van de Wiel MA, Lems WF, Nurmohamed MT, et al. Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2791-802.
 20. 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.* 2013;13:227-34.
 21. Milic V, Jekic B, Lukovic L, Bunjevacik V, Milasin J, Novakovic I, et al. Association of dihydrofolate reductase (DHFR) -317AA genotype with poor response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:178-83.
 22. Jekic B, Lukovic L, Bunjevacik V, Milic V, Novakovic I, Damnjanovic T, 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.* 2013;69:377-83.
 23. Lee YC, Cui J, Costenbader KH, Shadick NA, Weinblatt ME, Karlson EW. Investigation of candidate polymorphisms and disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Rheumatology (Oxford, England).* 2009;48:613-7.
 24. Kooloos WM, Wessels JA, van der Straaten T, Allaart CF, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2010;11:163-75.
 25. Taraborelli M, Andreoli L, Archetti S, Ferrari M, Cattaneo R, Tincani A. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and methotrexate: no association with response to therapy nor with drug-related adverse events in an Italian population of rheumatic patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27:499-502.
 26. Plaza-Plaza JC, Aguilera M, Canadas-Garre M, Chemello C, González-Utrilla A, Faus Dader MJ, et al. Pharmacogenetic polymorphisms contributing to toxicity induced by methotrexate in the southern Spanish population with rheumatoid arthritis. *OMICS.* 2012;16:589-95.
 27. Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, et al. ABCB1 C3435 T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:546-54.
 28. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics.* 2002;12:183-90.
 29. Mena JP, Salazar-Páramo M, González-López L, Gámez-Nava JJ, Sandoval-Ramírez L, Sánchez JD, et al. Polymorphisms C677 T and A1298 C in the MTHFR gene in Mexican patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: implication with elevation of transaminases. *Pharmacogenomics.* 2011;11:287-91.
 30. Aggarwal P, Naik S, Mishra KP, Aggarwal A, Misra R. Correlation between methotrexate efficacy & toxicity with C677 T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian J Med Res.* 2006;124:521-6.
 31. Pawlik A, Kurzawski M, Gornik W, Dabrowska-Zamojcin E, Drozdziak M. 677C > T and 1298A > C MTHFR polymorphisms affect arechin treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rep.* 2007;59:721-6.
 32. Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, et al. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:607-12.
 33. Kim SK, Jun JB, El-Sohemy A, Bae SC. Cost-effectiveness analysis of MTHFR polymorphism screening by polymerase chain reaction in Korean patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *J Rheumatol.* 2006;33:1266-74.
 34. Taniguchi A, Urano W, Tanaka E, Furihata S, Kamitsuji S, Inoue E, et al. 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. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17:383-90.
 35. Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader T, et al. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298 C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:1227-31.
 36. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, et al. The C677 T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2525-30.
 37. Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, 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.* 2006;54:1087-95.
 38. Grabar PB, Rojko S, Logar D, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms in the adenosine pathway. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:931-2.
 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.* 2013;28:164-8.
 40. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2766-74.
 41. Drozdziak 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.* 2007;7:404-7.

42. Owen SA, Lunt M, Bowes J, Hider SL, Bruce IN, Thomson W, 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*. 2013;13:137-47.
43. Hayashi H, Fujimaki C, Daimon T, Tsuboi S, Matsuyama T, Itoh K. Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes as a possible marker for predicting the outcome of methotrexate therapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharm Ther*. 2009;34:355-61.
44. Kurzawski M, Pawlik A, Safranow K, Herczynska M, Drozdziak M. 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2007;8:1551-9.
45. Wessels JA, Kooloos WM, De Jonge R, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Linssen A, et al. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2830-9.
46. Kung TN, Dennis J, Ma Y, Xie G, Bykerk V, Pope J, et al. RFC1 80G>A is a genetic determinant of methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis: a human genome epidemiologic review and meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:1111-20.
47. Lee YH, Song GG. Associations between the C677 T and A1298 C polymorphisms of MTHFR and the efficacy and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Drug Investig*. 2010;30:101-8.
48. Spyridopoulou KP, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with methotrexate toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22:117-33.
49. Fisher MC, Cronstein BN. Metaanalysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *J Rheumatol*. 2009;36:539-45.
50. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med*. 2003;11:593-600.
51. Binia A, Contreras AV, Canizales-Quinteros S, Alonzo VA, Tejero ME, Silva-Zolezzi I. Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism. *Genes Nutr*. 2014;9:421.
52. Song GG, Bae SC, Lee YH. Association of the MTHFR C677 T and A1298 C polymorphisms with methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2014;33:1715-24.
53. 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*. 2012;27:192-9.
54. Lima A, Bernardes M, Sousa H, Azevedo R, Costa L, Ventura F, et al. SLC19A1 80G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2014;15:807-20.
55. Aslibekyan S, Brown EE, Reynolds RJ, Redden DT, Morgan S, Baggott JE, et al. Genetic variants associated with methotrexate efficacy and toxicity in early rheumatoid arthritis: results from the treatment of early aggressive rheumatoid arthritis trial. *Pharmacogenomics*. 2014;14:48-53.
56. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19:823-8.
57. Xiao H, Xu J, Zhou X, Stankovich J, Pan F, Zhang Z, et al. Associations between the genetic polymorphisms of MTHFR and outcomes of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28:728-33.
58. Caliz R, del Amo J, Balsa A, Blanco F, Silva L, Sanmarti R, et al. The C677 T polymorphism in the MTHFR gene is associated with the toxicity of methotrexate in a Spanish rheumatoid arthritis population. *Scand J Rheumatol*. 2012;41:10-4.
59. Choe JY, Lee H, Jung HY, Park SH, Bae SC, Kim SK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, C677 T and A1298 C, are associated with methotrexate-related toxicities in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2012;32:1837-42.
60. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64:625-39.
61. Pincus T, Ferraccioli G, Sokka T, Larsen A, Rau R, Kushner I, et al. Evidence from clinical trials and long-term observational studies that disease-modifying anti-rheumatic drugs slow radiographic progression in rheumatoid arthritis: updating a 1983 review. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41:1346-56.
62. Emery P, Breedveld FC, Hall S, Durez P, Chang DJ, Robertson D, et al. Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double-blind, parallel treatment trial. *Lancet*. 2008;372:375-82.
63. Mora C, González A, Díaz J, Quintana G. [Financial cost of early rheumatoid arthritis in the first year of medical attention: three clinical scenarios in a third-tier university hospital in Colombia]. *Biomedica*. 2009;29:43-50.
64. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*. 2003;81:646-56.