

Marcadores genéticos de eficacia y toxicidad a metotrexato en una población española con artritis reumatoide

MILARA PAYÁ X^{1,2,3}, SANFELIU GARCÍA J^{1,2,3}, RUEDA CID A⁴, CALVO CATALÁ J⁴, GONZÁLEZ-CRUZ CERVELLERA MI⁴, CAMPOS FERNÁNDEZ C⁴

¹Servicio de Farmacia. Hospital General Universitario de Valencia

²Fundación de Investigación. Hospital General de Valencia

³Unidad de Investigación Clínica. Hospital General Universitario de Valencia

⁴Servicio de Reumatología y Metabolismo Óseo. Hospital General Universitario de Valencia

Correspondencia: Dr. Javier Calvo Catalá - Servicio de Reumatología y Metabolismo Óseo - Hospital General Universitario de Valencia - Avda. Tres Cruces, 2 - 46014 Valencia

✉ calvo_jav@gva.es

RESUMEN

El Metotrexato (MTX) es considerado como “patrón oro” del tratamiento de la artritis reumatoide (AR). Presenta una amplia gama de perfil de eficacia y de toxicidad dependiendo del individuo. Este estudio tiene como objetivo evaluar la influencia de factores clínicos y demográficos de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en los genes relacionados con el metabolismo de la AR y del MTX, así como la activación de los neutrófilos basales en la respuesta y en la toxicidad al MTX en monoterapia.

Métodos: En total 80 pacientes con AR fueron tratados en monoterapia con MTX durante 12 meses. Se recogieron las características clínicas y demográficas junto con el ARNm de neutrófilos en sangre para la expresión de genes y el DNA de la sangre para el genotipado. La expresión del ARNm de neutrófilo, se analizó en 8 marcadores inflamatorios en tiempo real por PCR y el DNA genotipado se ensayó en 16 SNPs localizados en 12 genes diferentes por la discriminación alélica.

Resultados: La escasa respuesta al MTX en monoterapia se asoció al taba-

quismo activo ($P=0,042$) y PNT22 rs2476601 CC homocigotos (3,55 (0,96-13,1) $P=0,009$), mientras que la positividad del anticuerpo anticitrulinado ($P=0,041$) y SLC01B1 rs11045879 CC genotipo (3,84 (1,57-14,12) $P=0,032$), se asoció con la toxicidad al MTX en un análisis univariante. Después de la corrección en un análisis multivariante, solo PNT22 rs2476601 CC y SLC01B1 rs11045879 CC genotipos se asociaron independientemente con una baja respuesta y toxicidad al MTX respectivamente. También se observó una asociación de la activación del neutrófilo basal periférico y la respuesta favorable al MTX.

Conclusión: Los genotipos PNT22 rs2476601 CC y SLC01B1 rs11045879 CC se asocian a una mala respuesta y toxicidad al MTX, mientras que la activación del neutrófilo basal estuvo asociada a la buena respuesta al tratamiento con MTX en monoterapia. Estos resultados podrían tener un gran valor para reforzar nuestro conocimiento sobre las influencias de los marcadores genéticos, clínicos y celulares en la actividad del MTX.

Palabras clave: Artritis reumatoide, metotrexato, farmacogenética, toxicidad, neutrófilos.

INTRODUCCIÓN

El Metotrexato (MTX) es actualmente un fármaco para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) de primera línea, muy eficaz en monoterapia y en combinación con otros DMARDs y terapias biológicas¹. En monoterapia, es eficaz en los pacientes DMARD-naïve y lleva a una baja actividad de la enfermedad en un 25-50% de pacientes con AR temprana dentro de los 6-12 meses^{1,2}.

El efecto máximo del MTX se logra tras 4-6 meses de tratamiento³. Con res-

pecto a esto, la dosis óptima tras escalada rápida, con suplementos de ácido fólico⁴, se debería mantener al menos 8 semanas para el éxito del tratamiento⁵. Por otra parte, entre el 15-30% de los pacientes desarrollan efectos adversos severos (EA) al fármaco¹.

En relación con la selección de pacientes con bajo riesgo de EA al MTX, podríamos ajustar e incrementar la dosis de MTX para intensificar la terapia. Por otro lado los predictores clínicos o genéticos de la resistencia al MTX podrían servirnos para

cambiar a otros DMARD, ya que las lesiones articulares de la AR una vez establecidas son irreversibles.

Aunque todavía no es posible determinar si un paciente responderá o no al MTX, se han identificado actualmente factores clínicos y biológicos asociados con el aumento de la eficacia: el sexo masculino, no fumadores, fase temprana de la enfermedad, DMARD-naïve, baja actividad de la enfermedad, corticoide concomitante, negatividad del epítipo compartido son factores de buena respuesta⁶.

Variaciones genéticas, tales como los polimorfismos genéticos en genes que codifican enzimas que intervienen en el mecanismo de acción del MTX también se han relacionado con la eficacia al MTX aunque con valor incierto. Varios estudios han demostrado que la presencia de variaciones en la respuesta clínica al MTX podría explicarse por los polimorfismos genéticos en enzimas de la ruta del folato tales como MTHFR, RFC1, GGH, TYMS, DHFR y ATIC entre otros^{7,8}.

El polimorfismo más estudiado es MTHFR C677T (rs1801133), que es responsable de la sustitución de una alanina por una valina, lo que lleva a una forma termolábil de la MTHFR con baja actividad⁹. De hecho, se ha sugerido que el alelo MTHFR 677T se relaciona con la falta de respuesta del MTX en la AR⁸.

Otros marcadores genéticos, como el alelo HLA-DRB1*04 parece estar asociado con una peor respuesta al MTX¹⁰. Sin embargo, a pesar de una investigación intensa, los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), no han sido claramente identificados como predictores de respuesta o toxicidad al MTX¹¹. En esta línea, otros marcadores biológicos se están proponiendo como predictores de respuesta al MTX.

Entre los marcadores biológicos, el aclaramiento de creatinina, el factor reumatoide (FR) y el anticuerpo anti-citrulina (ACPA), han sido sin éxito, propuestos como predictores de eficacia del MTX^{12,13}.

Otros estudios se han basado en el valor predictivo de diversas citoquinas séricas basales tales como TNF α , IL-1 β , IL-6 o IL-8 con la respuesta a MTX, con ninguna asociación clara⁶. Además, estudios recientes se han centrado en la activación de células basales inflamatorias como predictores de eficacia del MTX, lo que sugiere que por ejemplo, los niveles basales de IL-10 de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fue mayor en los respondedores al MTX que en los no respondedores¹⁴ o que un mayor porcentaje de los niveles basales de IL-4 en células T CD4+, se asoció con baja actividad de la enfermedad en seis a nueve meses de tratamiento con MTX¹⁵. Del mismo modo, la eficacia *in vitro* de la inhibición de la producción de TNF α de células T se asocia directamente

con una respuesta clínica favorable al MTX a los cuatro meses. En esta línea, la evidencia reciente sugiere que los neutrófilos podrían desempeñar un papel clave en las etapas iniciales y posteriores de la inflamación en la AR¹⁶, por lo que una medida de la actividad de los neutrófilos basal o los efectos del MTX sobre la activación de neutrófilos podría ser un valor potencial como predictor del resultado al MTX.

Este trabajo tiene como objetivo analizar los posibles marcadores de activación de neutrófilos, además de factores clínicos y genéticos como predictores de eficacia y toxicidad al MTX en una cohorte de pacientes con AR tratados con MTX en monoterapia. Los resultados proporcionados en este estudio pueden ayudar a reforzar nuestros conocimientos sobre las influencias de los marcadores clínicos, genéticos y celulares en la actividad del MTX.

MÉTODOS

Diseño del estudio y población

Se trata de un estudio prospectivo observacional farmacogenético realizado en el Servicio de Reumatología del Hospital General Universitario de Valencia. El período de seguimiento del estudio fue desde febrero de 2010 hasta junio de 2014. Los criterios de inclusión fueron: 1.

- Mayores de 18 años.
- Diagnóstico de AR.
- Tratamiento en monoterapia con metotrexato.
- Acceso a datos clínicos disponibles respecto a enzimas hepáticos, perfil hematológico, adherencia farmacológica y la evaluación de la actividad de la AR así como la toxicidad al MTX.

5. Autorización para disponer de muestras de sangre para las determinaciones genéticas y el aislamiento de neutrófilos. Los criterios de exclusión fueron:

- Pérdida de más del 20% de los datos clínicos contemplados en los criterios de inclusión.
- Pérdida de más del 20% de los datos de genotipos.
- Pacientes que interrumpieron el tratamiento antes del segundo mes de tratamiento con MTX debido a efectos secundarios.
- Embarazo o deseo de embarazo.

- Abuso de drogas.
- Cualquier contraindicación del uso de MTX.
- Coexistencia de otras enfermedades sistémicas del tejido conectivo, además de la AR.

Todos los pacientes con AR que participaron en esta investigación acordaron donar una muestra de sangre para la determinación del genotipo, el aislamiento de neutrófilos y la cuantificación de la expresión génica, después de haber firmado un consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital General Universitario de Valencia y se llevó a cabo de acuerdo con las disposiciones de la Declaración de Helsinki y Buenas Guías de Práctica Clínica. Los pacientes cumplían los criterios de clasificación de 2010 de la American College of Rheumatology (ACR) y la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR)¹⁷.

Todos los pacientes fueron tratados inicialmente con 10 mg por vía oral/semana de MTX en monoterapia. Esta dosis se aumentó en 5 mg cada tres semanas si los pacientes mantenían DAS 28 superior a 3,2. A los tres meses, si los pacientes no habían alcanzado una remisión DAS28 (<2,6), la vía de administración se cambió a subcutánea (SC) y si tras dosis máxima de 25 mg, seguía sin alcanzarse la remisión, el MTX se asoció con otros DMARDs sintéticos o DMARD biológicos y el paciente fue considerado como no respondedor a MTX en monoterapia. Los valores utilizados respecto a DAS28 fueron: remisión <2,6; baja actividad entre 2,6 y 3,2; actividad moderada entre 3,2 y 5,1 y alta actividad >5,1.

El ajuste de la terapia de MTX también se produjo cuando los pacientes desarrollaron toxicidad relacionada con este fármaco, definida por presentar cualquier efecto secundario relacionado con el tratamiento. En el momento de cada visita, el médico le pregunta al paciente sobre los efectos secundarios relacionados con MTX y se registran. Debido al efecto protector conocido de los suplementos de ácido fólico para la prevención de la aparición de toxicidad, este medicamento fue prescrito a todos los pacientes y se registró el cumplimiento ordinario.

Selección y genotipado de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

El ADN genómico se aisló de muestras de sangre entera utilizando el Mini Kit QIAamp DNA Blood (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Los SNPs seleccionados incluyeron SNPs pertenecientes a genes implicados en el metabolismo de los folatos, la farmacocinética de MTX, la inflamación y la inmunidad celular (véase el cuadro 1 complementario)⁶. Todos los SNPs se genotiparon con la técnica de discriminación alélica mediante análisis de PCR en tiempo real en un Fast Real-Time PCR System 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) utilizando TaqMan[®] GTXpress[™] Master Mix (Applied Biosystems) y TaqMan 5'exonuclease genotipado prediseñado de ensayos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems).

El aislamiento de neutrófilos humanos

Los neutrófilos se aislaron a partir de sangre venosa periférica antes de comenzar el tratamiento con MTX tal como se describe anteriormente¹⁸, utilizando dextrano 500 al 3% (en 0,9% de solución salina) en una proporción de 2: 1 y Ficoll-Paque Histopaque 1077 (Amershan Pharmacia Biotech, Barcelona, España). Las preparaciones fueron >97% de pureza en los neutrófilos como se evaluó por tinción de Giemsa y tenía una viabilidad de >99% según se midió mediante exclusión con azul de tripano.

RT-PCR en tiempo real

El ARN total se obtuvo a partir de neutrófilos aislados en condiciones basales utilizando TriPure[®] Aislamiento reactivo (Roche, Indianapolis, EE.UU.). La integridad del ARN extraído se confirmó con Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU). La transcripción inversa se realizó en 300 ng de ARN total con un kit de reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EE.UU.). cDNA se amplificó con los cebadores y sondas específicas prediseñados por Applied Biosystems para FcGR11A, FcGR11B, STAT3, JAK2, TNF α , TGF β 1, MMP9 y

la IL-10 en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando Universal Master Mix (Applied Biosystems). La expresión del gen diana se expresa como el incremento o disminución relativa a la expresión de GAPDH como control endógeno (Applied Biosystems; 4310884E). Se calculó el valor medio de las repeticiones para cada muestra y se expresó como el ciclo umbral (Ct). A continuación, el nivel de expresión génica se calculó como la diferencia (Ct) entre el valor de Ct del gen diana y el valor Ct de GAPDH. Los cambios veces en los niveles de ARNm del gen diana se designaron 2-Ct.

El análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo de las variables iniciales. Antes del análisis estadístico, la distribución normalidad y la homogeneidad de las variables se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas se expresaron como media \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartil), en función de su distribución, y las variables discretas se expresaron como porcentaje. Haploview V4.1 Software (<https://www.broad.harvard.edu/haploview/haploview>), se utilizó para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los SNPs utilizando la prueba χ^2 de bondad de ajuste. Los SNPs de genes con una frecuencia menor alelo menos del 5% o un P-valor de equilibrio de Hardy-Weinberg por debajo de 0,001 fueron excluidos del análisis.

Los SNPs que se asociaron con la respuesta o toxicidad al MTX mostrando un valor de p inferior a 0,05 fueron seleccionados para su posterior análisis. Se utilizó la prueba t de Student o la prueba de Mann-Whitney para comparar las variables continuas con distribución normal con respuesta MTX o toxicidad MTX. Las comparaciones de variables cualitativas, incluido el genotipo, las frecuencias alélicas, variables clínicas, analíticas y de terapia, con los diferentes tipos de respuesta MTX o toxicidad fueron analizados por la prueba de χ^2 . La *odds ratio* (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95% se calcularon utilizando Woolf

aproximación. Se llevo a cabo un análisis de regresión logística multivariante, incluyendo como co-variables fumar, ACPA, así como los factores que se asociaron con la respuesta o toxicidad con un valor de P <0,05 en el análisis univariado. Los análisis descriptivos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 20.0 liberar (IBM Corporation, Somers, Nueva York, EE.UU.).

RESULTADOS

Pacientes

Un total de 100 pacientes cumplieron los criterios de inclusión para este estudio. De estos, se excluyeron 20 (20%) individuos por la pérdida de más de 20% de los datos clínicos (3 pacientes), pérdida de más de 20% de los datos de genotipado (4 pacientes) o debido a la combinación temprana (antes el segundo mes de tratamiento) de MTX con otros DMARDs (13 pacientes). Finalmente, 80 pacientes fueron incluidos en el análisis final. Tras el final de los primeros 12 meses de tratamiento con MTX en monoterapia, 45 (56,2%) pacientes mostraron una buena respuesta al MTX y 35 (43,8%) presentaron falta de respuesta. Por otra parte, en 14 (17,5%) pacientes, se produce reducción de la dosis (10% de los casos) o interrupción del tratamiento con MTX (90% de los casos), debido principalmente a los efectos adversos gastrointestinales, hematológicas y elevación de las enzimas hepáticas. Las características clínicas de los respondedores y no respondedores, así como de los pacientes que mostraron o no toxicidad a MTX se refleja en la tabla 1.

La cohorte de pacientes con una buena respuesta al MTX mostró hábitos tabáquicos significativos inferiores (26,6% de los fumadores) que los no respondedores (37,1% de los fumadores; P <0,05).

Los pacientes que experimentaron EA a MTX, mostraron menor positividad ACPA basal (42,8%), que los pacientes sin toxicidad (69,6%; P <0,05) (tabla 1).

No se encontraron otras diferencias basales entre las características clínicas de los respondedores y de los no respondedores, así como con los pacientes con o sin toxicidad a MTX.

TABLA 1

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS BASALES DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS						
Datos clínicos basales	Respondedores (n=45)	No respondedores (n=35)	n	Toxicidad (n=14)	Notoxicidad (n=66)	p
Edad (años)	51,3 ± 10,3	53,1 ± 12,4	0,48	54,7 ± 15,2	51,8 ± 14,2	0,29
Sexo femenino n (%)	34 (75,5)	28 (80)	0,52	3 (21,4)	15 (22,7)	0,19
DAS28, inicio MTX	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,5	0,26	4,3 ± 0,8	4,1 ± 0,6	0,31
DAS28, tras 12 meses MTX,	2,19 ± 0,2	3,89 ± 0,3	0,001	3,8 ± 1,2	3,75 ± 1,41	0,15
Duración enfermedad (años)	7,1 ± 6,4	8,9 ± 5,7	0,24	9,6 ± 5,4	7,4 ± 6,2	0,084
FR positivo, n (%)	37 (82,2)	26 (74,3)	0,091	11 (78,5)	54 (81,8)	0,34
CCP positivo, n (%)	29 (64,4)	21 (60)	0,54	6 (42,8)	46 (69,6)	0,041
Fumadores (%)	12 (26,6)	13 (37,1)	0,042	5 (35,7)	23 (34,8)	0,47
MTX mg (min-max)	15 (12,5-25)	18 (12,5-25)	0,28	15 (12,5-25)	15 (12,05-25)	1

TABLA SUPLEMENTARIA 1

POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) SELECCIONADOS PARA GENOTIPIFICACIÓN								
Nombre / gen	Función	SNPs	ObsHET	PredHET	HWpval	MAF	Alelos	Gebnotipado excluido
MTHFR_C677T	Vía de folato	rs1801133	0,547	0,484	0,309	0,411	C:T	
MTHFR_A1298C	Vía de folato	rs1801131	0,411	0,402	1,0	0,279	A:C	
SLCO1B1_C>T	MTX farmacocinética	rs11045879	0,274	0,28	1,0	0,168	T:C	
TNF_T-875C	Inflamación	rs1799724	0,189	0,221	0,319	0,126	C:T	
TNF_G-308A	Inflamación	rs1800629	0,137	0,145	0,901	0,079	G:A	
TNF_G-238A	Inflamación	rs361525	0,158	0,163	1,0	0,089	G:A	
IL-10_G-1082A	Inflamación	rs1800896	0,442	0,471	0,667	0,379	A:G	
IL-4_C33T	Inflamación	rs2070874	0,263	0,314	0,198	0,195	C:T	
TNFRSF1B_T676G	Inflamación	rs1061622	0,242	0,287	0,223	0,174	T:G	
FcGRIIIA_C>A	Inmunidad	rs396991	0,442	0,424	0,915	0,305	A:C	
FcGRIIA_A>G	Inmunidad	rs1801274	0,611	0,499	0,052	0,474	G:A	
STAT4_G>T	Inmunidad	rs7574865	0,379	0,388	0,975	0,263	G:T	
PTPN22_C1858T	Inmunidad	rs2476601	0,211	0,205	1,0	0,116	C:T	
IL-6Rso_A358C	Inflamación	rs2228145	0,463	0,453	1,0	0,347	A:C	
IL-6_G572C	Inflamación	rs1800796	0,126	0,154	0,242	0,084	G:C	
PDZD2_C>G	Inflamación	rs1532269	0,232	0,378	6,0E-4	0,253	G:C	*HW P-value < 0,001

* SNP con equilibrio Hardy-Weinberg (HW) P-valor < 0,001; ** SNPs con frecuencia menor alelo (MAF) < 0,05; ObsHET: heterocigosidad observada; PredHET: predice heterocigoto.

Selección de polimorfismos de nucleótido único y asociación con la respuesta y toxicidad a MTX

Se seleccionaron un total de 16 SNPs, localizados en 12 genes diferentes relacionados con el metabolismo de los folatos, MTX farmacocinético, la respuesta inflamatoria y la respuesta de las células inmunes para el análisis primario (cuadro 1 complementario). De ellos, 1 SNPs situados en PDZD2 fue excluido como resultado de un P-valor de equilibrio de Hardy-Weinberg por debajo de 0,001. Otros 15 SNPs se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg indicando que no existía ningún sesgo o error de genotipificación de estratificación de la población.

Tras el análisis de la distribución univariante de diferentes SNPs entre pacientes con respuesta y toxicidad MTX, solo se observó una asociación significativa con la respuesta de MTX en el gen PTPN22 (rs2476601), y con una toxicidad a MTX en el gen SLCO1B1 (rs11045879) como se representa en la tabla 2 y la tabla 3, respectivamente.

El genotipo homocigoto CC de rs2476601 PTPN22 SNP se asoció con más fuerza a una mala respuesta a MTX (OR (IC del 95%): 3,55 (0,96 a 13,1; P = 0,009), mientras que el alelo T se asoció con una respuesta favorable (OR (95% CI): 3,48 (0,84 a 9,47; P = 0,016) (tabla 2). Por otra parte, la toxicidad a MTX se asoció con rs11045879 SLCO1B1 CC genotipo homocigótico (OR (IC 95%): 3,84 (1,57-14,12; P = 0,032) en comparación con los genotipos CT/TT (Tabla 3).

El análisis multivariante

Según el análisis univariante, SNPs en genes PTPN22 (rs2476601) y SLCO1B1 (rs11045879), se introdujeron en un modelo multivariante de regresión logística ajustado por fumar en la actualidad, y ACPA positivos. En el análisis multivariante PTPN22 rs2476601 TT/genotipos CT se asociaron independientemente con la respuesta MTX mientras SLCO1B1 rs11045879 CC genotipo se asoció de forma independiente con la toxicidad del MTX (Tabla 4). No se detectó asociación independiente para fumar o positividad actual de ACPA probablemente debido al

pequeño tamaño de la población AR a estudio.

Asociación de la activación del neutrófilo basal con la respuesta y la toxicidad MTX

Los neutrófilos de sangre periférica fueron aislados de los mismos 80 pacientes con AR estudiados antes de comenzar MTX en monoterapia. Se analizó la expresión de genes de varios marcadores relacionados con la activación de neutrófilos para evaluar la posible asociación con eficacia o toxicidad a MTX. Entre ellos, TNF α y STAT3 fueron significativamente sobreexpresados en los neutrófilos basales de los pacientes con AR que respondieron a MTX en monoterapia en comparación con los no respondedores, mientras que no se observaron diferencias en la expresión de FcGRIIIA, FcGRIIIB, JAK2, TGF β 1, MMP9 o IL-10. Por el contrario, no se detectó ninguna diferencia entre el perfil de expresión génica de neutrófilos en pacientes con y sin toxicidad MTX.

DISCUSIÓN

Sobre la base de los estudios publicados es difícil establecer claramente qué polimorfismos genéticos, características clínicas o datos de laboratorio serían buenos factores predictivos para evaluar la eficacia y el riesgo de desarrollar efectos adversos durante el tratamiento con MTX. En este trabajo, hemos observado una asociación del tabaquismo activo y PNTP22 rs2476601 CC homocigotos, con una mala respuesta a la monoterapia con MTX, mientras que la positividad de los ACPA y rs11045879 SLCO1B1 CC genotipo, se asoció con toxicidad MTX en el análisis univariante. Después de la corrección para el análisis multivariante, sólo PNTP22 rs2476601 CC y rs11045879 SLCO1B1 genotipos CC, se asociaron independientemente con mala respuesta y toxicidad a MTX respectivamente. Además, también se observó una asociación de la activación de los neutrófilos periféricos basales y la respuesta a MTX favorable.

En contraste con otros informes, no se observó ninguna asociación entre rs1801133 MTHFR y polimorfismos rs1801131 ni con respuesta ni con toxicidad

a MTX. Aunque los resultados contradictorios se pueden observar a lo largo de la literatura, meta-análisis recientes indican que rs1801133 MTHFR y polimorfismos rs1801131 no son indicadores fiables de respuesta o toxicidad al tratamiento con MTX en pacientes con AR^{19,20}, lo cual está en línea con nuestras observaciones.

La inflamación sistémica es una característica común de los pacientes no controlados con AR y podría influir en la actividad de MTX o modular la toxicidad a MTX. Así, por ejemplo, varios polimorfismos genéticos localizados en los genes inflamatorios, tales como TNF α , IL-6, IL-4, IL-10, FcGRIIIA, FcGRIIA y STAT4 se han asociado con la presencia de AR en diferentes estudios²¹⁻²⁵, sin embargo, su papel en la eficacia o toxicidad de MTX es desconocido. En este sentido, no se encontró ninguna asociación de estos polimorfismos genéticos con la respuesta o EA a MTX, lo cual descarta la hipótesis inicial de que los patrones moleculares involucrados en la AR podrían estar implicados en la actividad MTX.

Un polimorfismo funcional del alelo 1858T del gen PTPN22, se ha visto asociado con varias enfermedades autoinmunes tales como AR. El gen PTPN22, codifica para la tirosina fosfatasa LYP intracelular, que actúa como un regulador negativo de la activación de células T. De hecho, el alelo 1858T produce una fuerte inhibición de la activación de las células T autorreactivas, que se traduce en el desarrollo de timocitos inmaduros con una respuesta anormal a los antígenos presentados²⁶.

Especulamos que los pacientes con AR que tienen susceptibilidad en alelo 1858T gen PTPN22 podrían responder de manera diferente a MTX que los que lleven 1858C. Para nuestro conocimiento no es solo un informe que trató de aclarar esta cuestión²⁷. En este sentido, Majorczyk no encontró ninguna asociación del genotipo PTPN22 con respuesta MTX. Sin embargo, se observó tres veces mayor frecuencia de homocigotos 1858TT en el grupo de respondedores. Finalmente no encontraron diferencias alelo T porque heterocigotos CT fueron similares en ambos grupos resultantes de la frecuencia prácticamente idéntica del alelo T²⁷. En este trabajo, se

TABLA 2

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIPO ÚNICO EN RESPONDEDORES Y NO RESPONDEDORES PACIENTES DE ARTRITIS REUMATOIDE TRATADOS EN MONOTERAPIA CON METOTREXATO.

	Respondedores (n=45)	No respondedores (n=35)			
Gene/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95% CI)	p
MTHFR					
rs1801133					
CC	16 (35,5)	11 (31,4)	0,221	1,07 (0,75-1,37)	0,891
CT	24 (51,3)	20 (57,1)			
TT	5 (11,1)	4 (11,4)			
<i>Allele of response</i>					
C	(58,1)	(60,2)	0,051	1,1 (0,63-1,64)	0,823
rs1801131					
AA	23 (51,1)	17 (48,6)	0,107	1,06 (0,72-1,58)	0,741
AC	19 (42,2)	16 (45,7)			
CC	3 (6,6)	2 (5,7)			
<i>Allele of response</i>					
A	(70,8)	(74,3)	0,262	0,98 (0,54-1,37)	0,608
SLCO1B1					
rs11045879					
CC	0 (0)	2 (5,7)	0,008	1,01 (0,62-1,65)	0,911
CT	15 (33,3)	9 (25,7)			
TT	30 (66,6)	24 (68,6)			
<i>Allele of response</i>					
C	(16,7)	(17,1)	0,007	1,08 (0,78-1,59)	0,937
TNFα					
rs1799724					
TT	33 (73,3)	28 (80)	0,277	1,18 (0,62-2,23)	0,599
TC	9 (20)	7 (20)			
CC	3 (6,7)	0 (0)			
<i>Allele of response</i>					
T	(86,7)	(88,6)	0,145	1,04 (0,59-1,74)	0,703
rs1800629					
GG	39 (86,6)	30 (87,7)	0,151	1,15 (0,58-2,26)	0,698
GA	5 (11,1)	5 (14,3)			
AA	1 (2,2)	0 (0)			
<i>Allele of response</i>					
A	(8,6)	(7,5)	0,07	1,02 (0,61-1,64)	0,792
rs361525					
GG	39 (86,7)	29 (82,8)	0,543	1,27 (0,69-2,34)	0,461
GA	4 (8,9)	6 (17,1)			
AA	2 (4,4)	0 (0)			

(Continúa en página siguiente)

TABLA 2					
<i>(Continuación)</i>					
	Respondedores (n=45)	No respondedores (n=35)			
<i>Allele of response</i>					
G	(89,2)	(94,3)	1,422	1,14 (0,68-1,87)	0,233
IL-10					
rs1800896					
GG	5 (11,1)	8 (22,8)	2,861	1,79 (0,78-4,08)	0,091
GA	24 (53,3)	11 (31,4)			
AA	16 (35,5)	16 (45,7)			
<i>Allele of response</i>					
G	(37,5)	(38,6)	0,022	1,05 (0,54-1,67)	0,883
IL-4					
rs2070874					
CC	30 (66,6)	23 (65,7)	0,146	1,09 (0,69-1,68)	0,703
CT	14 (31,1)	9 (25,7)			
TT	1 (2,2)	3 (8,5)			
<i>Allele of response</i>					
T	(16,7)	(24,3)	1,637	1,03 (0,62-1,81)	0,201
TNFRSF1B					
rs1061622					
GG	31 (68,8)	28 (80)	0,939	1,23 (0,82-1,85)	0,332
TG	14 (31,1)	7 (20)			
TT	1 (2,2)	0 (0)			
<i>Allele of response</i>					
T	(15,8)	(20,1)	0,535	1,01 (0,59-1,78)	0,464
FCGR3A					
rs396991					
AA	18 (40)	19 (54,3)	0,770	1,30 (0,48-5,31)	0,380
AC	22 (48,8)	14 (40)			
CC	5 (1,1)	2 (5,7)			
<i>Allele of response</i>					
A	(69,2)	(70,4)	0,014	0,98 (0,61-1,81)	0,9042
FCGR2A					
rs1801274					
AA	8 (17,7)	7 (20)	0,042	1,06 (0,58-1,61)	0,838
AG	30 (66,6)	20 (57,1)			
GG	7 (15,5)	8 (22,8)			
<i>Allele of response</i>					
A	(45,8)	(50,2)	0,308	1,12 (0,64-1,98)	0,579
STAT4					
rs7574865					
GG	26 (57,7)	14 (40)	2,841	1,41 (0,93-2,11)	0,092
GT	15 (33,3)	16 (45,7)			
TT	4 (8,8)	4 (11,4)			

(Continúa en página siguiente)

TABLA 2					
(Continuación)					
	Respondedores (n=45)	No respondedores (n=35)			
<i>Allele of response</i>					
T	(22,5)	(32,9)	2,446	1,14 (0,71-1,95)	0,118
PTPN22					
rs2476601					
CC	32 (71,1)	33 (94,3)	6,911	3,55 (0,96-13,1)	0,009
CT	12 (26,6)	2 (5,7)			
TT	1 (2,2)	0 (0)			
<i>Allele of response</i>					
T	(15,8)	(2,5)	5,758	3,48 (0,84-9,47)	0,016
IL-6R					
rs2228145					
AA	14 (31,1)	17 (48,6)	2,301	1,13 (0,78-3,51)	0,316
AC	23 (51,1)	14 (40)			
CC	8 (17,7)	4 (11,4)			
<i>Allele of response</i>					
A	(62,5)	(70,1)	1,097	1,11 (0,67-2,87)	0,295
IL-6					
rs1800796					
CC	35 (77,7)	33 (94,3)	0,235	1,07 (0,58-1,97)	0,628
GC	8 (17,7)	2 (2,2)			
GG	2 (4,4)	0 (0)			
<i>Allele of response</i>					
C	(90,8)	(92,9)	0,381	1,11 (0,61-1,81)	0,411

SNP: single nucleotide polymorphism; OR: odds ratio; CI: intervalo de confianza.

encontró que el alelo T se asoció con buena respuesta MTX. Como los homocigotos 1858TT previamente reportados fueron mayores en el grupo de respuesta, pero el grupo TC también se incrementó en el grupo de respuesta que a su vez asociado el alelo T con buena respuesta al MTX. Aunque estos resultados son preliminares, los pacientes con AR con PTPN22 1858TT genotipo y el consiguiente mal funcionamiento de los linfocitos T podrían ser más sensibles a las propiedades inmuno-supresoras y anti-inflamatorias de MTX.

Respecto rs11045879 SLCO1B1, portadores C fueron asociados con la toxicidad relacionada con MTX en este trabajo. Portadores C se han asociado con una disminución del aclaramiento de MTX, mayores concentraciones plasmáticas de MTX y de la toxicidad en los protocolos oncológicos a altas dosis de MTX²⁸. SLCO1B1 se ha relacionado con el transporte de MTT *in vitro*,

así como otros compuestos tales como bilirrubina, las estatinas, rifampicina, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, y el metabolito activo de irinotecan, SN-38^{29,30}. A pesar de que el transportador SLCO1B1 se expresa principalmente en la membrana basolateral de los hepatocitos³¹, su mRNA también se ha detectado en otros tejidos, incluyendo los enterocitos³², lo que puede explicar la retención intracelular MTX (gastrointestinal y hepática) que conduce a la citotoxicidad.

Además de los marcadores genéticos, hemos observado una asociación de fumar con una mala respuesta a MTX y positividad ACPA con toxicidad a MTX. El tabaquismo se asocia con un aumento del estrés oxidativo y la inflamación, así como con el aumento de ACPA y la severidad de la AR. En trabajos previos se ha establecido una asociación de factores clínicos y demográficos con respuesta favorable a MTX como

el sexo masculino, no fumadores, fase inicial de la enfermedad, ausencia de DMARD previos o baja actividad de la enfermedad. Aunque en nuestro trabajo solo se observó una asociación de no fumadores con una mejor respuesta a MTX no podemos descartar una influencia de otros factores clínicos en cohortes más grandes de pacientes con AR.

La AR es una enfermedad inflamatoria que comparte inflamación sistémica y sinovial. Los neutrófilos representan alrededor del 60% del total de los leucocitos periféricos, y son las primeras células reclutadas a los lugares de inflamación, como el líquido sinovial. Los neutrófilos inflamatorios comparten muchas de las funciones de los macrófagos, particularmente con respecto a la generación y a la expresión de moléculas inmuno-reguladoras (citocinas, quimiocinas y antígenos MHC de clase II). Muchas de estas funciones adquiridas son

TABLA 3					
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO EN PACIENTES DE ARTRITIS REUMATOIDE QUE DEMOSTRARON TOXICIDAD A LA MONOTERAPIA CON METOTREXATO					
	Toxicidad (n=14)	No toxicidad (n=66)			
Gene/ SNPs	N (%)	N (%)	χ^2	OR (95% CI)	\square value
MTHFR					
rs1801133					
CC	6 (42,8)	22 (33,3)	0,638	1,21 (0,64-3,14)	0,728
CT	7 (50,1)	37 (56,1)			
TT	1 (7,1)	8 (12,1)			
<i>Allele of toxicity</i>					
C	(58,8)	(60,1)	0,016	1,42 (0,54-3,68)	0,898
rs1801131					
AA	8 (57,1)	33 (50,1)	1,948	1,10 (0,77-1,25)	0,378
AC	4 (28,6)	30 (45,5)			
CC	2 (14,3)	4 (6,1)			
<i>Allele of toxicity</i>					
A	(71,9)	(73,3)	0,027	1,31 (0,49-3,41)	0,871
SLCO1B1					
rs11045879					
CC	2 (14,3)	1 (1,5)	6,335	3,84 (1,57-14,12)	0,032
CT	2 (14,3)	21 (31,8)			
TT	10 (71,4)	45 (68,2)			
<i>Allele of toxicity</i>					
C	(28,6)	(16,1)	4,141	2,71 (0,89-9,17)	0,037
TNFα					
rs1799724					
TT	12 (85,7)	51 (77,3)	1,776	1,51 (0,42-6,96)	0,414
TC	2 (14,3)	13 (19,7)			
CC	0 (0)	3 (4,5)			
<i>Allele of toxicity</i>					
T	(13,3)	(12,5)	0,016	1,08 (0,59-4,41)	0,899
rs1800629					
GG	12 (85,7)	59 (89,4)	0,059	1,18 (0,31-4,53)	0,808
GA	2 (14,3)	8 (12,1)			
AA	0 (0)	1 (1,5)			
<i>Allele of toxicity</i>					
A	(10,1)	(7,5)	0,217	1,14 (0,52-3,47)	0,641
rs361525					
GG	10 (71,4)	58 (87,9)	1,295	1,7 (0,54-5,28)	0,523
GA	3 (21,4)	8 (12,1)			
AA	1 (7,2)	3 (4,6)			

(Continua en página siguiente)

TABLA 3					
<i>(Continuación)</i>					
	Respondedores (n=45)	No respondedores (n=35)			
<i>Allele of toxicity</i>					
G	13,3	8,1	0,841	1,21 (0,61-2,84)	0,359
IL-10					
rs1800896					
GG	2 (14,3)	11 (16,7)	0,795	1,14 (0,29-4,53)	0,735
GA	5 (37,7)	31 (46,9)			
AA	7 (50,1)	25 (37,9)			
<i>Allele of toxicity</i>					
G	(70,1)	(60,6)	0,941	1,08 (0,47-2,71)	0,331
IL-4					
rs2070874					
CC	10 (71,4)	44 (66,7)	2,721	1,2 (0,42-3,47)	0,257
CT	2 (14,3)	19 (28,9)			
TT	2 (14,3)	3 (4,5)			
<i>Allele of toxicity</i>					
T	(23,3)	(18,8)	1,241	1,08 (0,67-1,97)	0,256
TNFRSF1B					
rs1061622					
GG	11 (78,6)	49 (72,1)	0,178	1,05 (0,85-1,30)	0,673
TG	3 (21,4)	18 (26,5)			
TT	0	1 (1,5)			
<i>Allele of toxicity</i>					
T	(86,7)	(81,9)	0,404	1,10 (0,85-1,29)	0,254
FCGR3A					
rs396991					
AA	7 (50,1)	30 (44,8)	0,693	1,11 (0,73-1,68)	0,707
AC	5 (35,7)	31 (46,3)			
CC	2 (14,2)	6 (8,9)			
<i>Allele of toxicity</i>					
A	(76,7)	(68,1)	0,869	1,15 (0,68-1,87)	0,351
FCGR2A					
rs1801274					
AA	2 (14,3)	13 (19,4)	0,206	1,06 (0,84-1,36)	0,902
AG	9 (64,3)	41 (61,2)			
GG	3 (21,4)	13 (19,4)			
<i>Allele of toxicity</i>					
A	(56,7)	(51,9)	0,233	1,01 (0,51-2,14)	0,629
STAT4					
rs7574865					
GG	7 (50)	35 (52,2)	0,103	1,09 (0,35-3,46)	0,951
GT	6 (42,9)	26 (38,8)			
TT	1 (7,1)	6 (9)			

(Continúa en página siguiente)

TABLA 3
(Continuación)

	Respondedores (n=45)	No respondedores (n=35)			
<i>Allele of toxicity</i>					
T	(76.7)	(73.1)	0.163	1.01 (0.83-1.24)	0.686
PTPN22					
rs2476601					
CC	11 (78.6)	55 (80.9)	0.095	1.05 (0.79-1.37)	0.758
CT	3 (21.4)	12 (17.6)			
TT	0 (0)	1 (1.5)			
<i>Allele of toxicity</i>					
T	(13.3)	(11.2)	0.107	1.04 (0.79-1.37)	0.743
IL-6R					
rs2228145					
AA	7 (50)	25 (37.3)	1.048	1.53 (0.59-3.95)	0.592
AC	6 (42.9)	32 (47.8)			
CC	1 (7.1)	10 (14.9)			
<i>Allele of toxicity</i>					
A	(70.1)	(64.4)	0.353	1.11 (0.48-3.45)	0.553
IL-6					
rs1800796					
CC	0 (0)	2 (3)	2.94	1.16 (0.61-3.11)	0.230
GC	0 (0)	10 (14.9)			
GG	14 (100)	55 (82.1)			
<i>Allele of toxicity</i>					
C	(13.3)	(7.5)	1.11	1.19 (0.51-2.94)	0.291

SNP: single nucleotide polymorphism; OR: odds ratio; CI: intervalo de confianza.

TABLA 4
PREDICTORES INDEPENDIENTES DE RESPUESTA Y TOXICIDAD EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE TRATADOS CON MONOTERAPIA CON METOTREXATO

	Respuesta	P	Toxicidad	P
Parámetros	OR (95% CI)		OR (95% CI)	
Fumadores	1,70 (0,67-4,53)	0,092		
PTPN22 rs2476601 (TT/CT vs. CC)	2,11 (1.21-9,48)	0,041		
Anti-CCP positivos			1,61 (0,98-7,24)	0,093
SLCO1B1 rs11045879 (CC vs. CT/TT)			1,95 (0,82-9,87)	0,049

el resultado de los cambios rápidos y selectivos en la expresión génica que se produce cuando los neutrófilos se activan durante la inflamación. En este trabajo se analizó la expresión de los marcadores moleculares de la activación de neutrófilos que están implicados en la AR, como por ejemplo, los receptores de inmunoglobulina y FcGRIIIA FcGRIIIB, las proteínas de degradación de la matriz tales como MMP9, moléculas inflamatorias TNF, IL-

4, IL-10, así como señales celulares moleculares como JAK2 y STAT3 y factores fibróticos representados por TGFβ1. En este estudio, se observó un exceso de expresión de TNF-α y STAT3 (ambos aumentaron en la AR) en los neutrófilos basales de los pacientes respondedores a MTX. A nuestro entender este es el primer informe que asocia sobreactivación basal de neutrófilos en sangre periférica con una mejor respuesta a MTX que puede reflejar

una preferencia de inhibición de MTX de funciones de los neutrófilos y la viabilidad. De hecho, la neutropenia es uno de los EA inducida por MTX³³, que refuerzan la hipótesis de que AR fenotipo caracterizada por sobre-activación de neutrófilos podría ser más sensibles al tratamiento con MTX. Sin embargo, además de la importancia potencial de nuestros resultados, estamos conscientes de las posibles limitaciones, especialmente el tamaño de la muestra.

En resumen, se observó una asociación del alelo PTPN22 1858T con respuesta a MTX y SLCO1B1 rs11045879 C alelo con la toxicidad del MTX. Los factores clínicos, como el tabaquismo y los ACPA se asociaron a una mala respuesta y toxicidad, respectivamente, solo en el análisis univariante y la sobre-activación de neutrófilos basales se asoció con una mejor respuesta a MTX. Estos resultados pueden ser de valor potencial para reforzar nuestro conocimiento sobre las influencias de marcadores clínicos, genéticos y celulares sobre la actividad del MTX.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por becas de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH), de I + D + I proyecto SAF2011-26443 (JC), FIS CP11 / 00293 (JM), FIS PI14 / 01733 (JM), ADE10 / 00020 (Gobierno español; JC, JM), y becas de investigación del Gobierno Regional Prometeo II / 2013/014 (JC, JM). *Este trabajo ampliado, ha sido aceptado para su publicación en la revista *Therapeutic and Drug Monitoring*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, 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.
- 2.- Kavanaugh A, Fleischmann RM, Emery P, Kupper H, Redden L, Guerette B, Santra S, Smolen JS. Clinical, functional and radiographic consequences of achieving stable low disease activity and remission with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone in early rheumatoid arthritis: 26-week results from the randomised, controlled OPTIMA study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:64-71.
- 3.- Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, Sharp J, Perez JL, Spencer-Green GT. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2006;54:26-37.
- 4.- Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1100-04.
- 5.- Visser K, van der Heijde D. Optimal dosage and route of administration of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1094-99.
- 6.- Romao VC, Canhao H, Fonseca JE. Old drugs, old problems: where do we stand in prediction of rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and other synthetic DMARDs? *BMC Med* 2013;11:17-22.
- 7.- 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* 2013;13:227-34.
- 8.- Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Kerstens PJ, van Zeven D, Breedveld FC, Dijkmans BA, 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.
- 9.- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-13.
- 10.- Mori S, Hirose J, Yonemura K. Contribution of HLA-DRB1*04 alleles and anti-cyclic citrullinated antibodies to development of resistance to disease-modifying antirheumatic drugs in early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2010;29:1357-66.
- 11.- Ranganathan P. The challenges of methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2012;13:377.
- 12.- Aletaha D, Smolen JS. The rheumatoid arthritis patient in the clinic: comparing more than 1,300 consecutive DMARD courses. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1367-74.
- 13.- Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S, Kievit W, Barrera P, Allaart CF, Huizinga TW, Guchelaar HJ. A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1765-75.
- 14.- Seitz M, Zwicker M, Wider B. Enhanced in vitro induced production of interleukin 10 by peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis is associated with clinical response to methotrexate treatment. *J Rheumatol* 2001;28:496-01.
- 15.- Rudwaleit M, Yin Z, Siebert S, Grolms M, Radbruch A, Braun J, Sieper J. Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor alpha, increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4. *Ann Rheum Dis* 2000;59:311-14.
- 16.- Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:1618-31.
- 17.- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569-81.
- 18.- Milara J, Juan G, Peiro T, Serrano A, Cortijo J. Neutrophil activation in severe, early-onset COPD patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of antioxidant therapy. *Respiration* 2012;83:147-58.
- 19.- 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* 2010;30:101-08.
- 20.- Owen SA, Lunt M, Bowes J, Hider SL, Bruce IN, Thomson W, Barton A. MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms. *Pharmacogenomics J* 2013;13:137-47.
- 21.- Li X, Chai W, Ni M, Xu M, Lian Z, Shi L, Bai Y, Wang Y. The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Biomed Res Int* 2014;265-75.
- 22.- Radstake TR, Petit E, Pierlot C, van de Putte LB, Cornelis F, Barrera P. Role of Fc gamma receptors IIA, IIIA, and IIIB in susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:926-33.
- 23.- Tong G, Zhang X, Tong W, Liu Y. Association between polymorphism in STAT4 gene and risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Hum Immunol* 2013;74:586-92.
- 24.- Toonen EJ, Barrera P, Fransen J, de Brouwer AP, Eijssbouts AM, Miossec P, Marotte H, Scheffer H, van Riel PL, Franke B, et al. Meta-analysis identified the TNFA -308G > A promoter polymorphism as a risk factor for disease severity in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R264.
- 25.- Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, Cheng R, Chen C, Lu J. The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Cytokine* 2011;56:351-55.
- 26.- Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 2005;37:1317-19.
- 27.- Majorczyk E, Pawlik A, Kusnierczyk P. PTPN22 1858C>T polymorphism is strongly associated with rheumatoid arthritis but not with a response to methotrexate therapy. *Int Immunopharmacol* 2010;10:1626-29.
- 28.- Gorick K, Kovac V, Jazbec J, Zakotnik B, Lamovec J, Dolzan V. Influence of the folate pathway and transporter polymorphisms on methotrexate treatment outcome in osteosarcoma. *Pharmacogenet Genomics* 2014;24:514-21.
- 29.- Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, Adachi H, Fujiwara K, Okabe M, Suzuki T, et al. LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2001;120:1689-99.
- 30.- Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:873-79.
- 31.- Konig J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:156-64.
- 32.- Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG, et al. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:362-70.
- 33.- Mayall B, Poggi G, Parkin JD. Neutropenia due to low-dose methotrexate therapy for psoriasis and rheumatoid arthritis may be fatal. *Med J Aust* 1991;155:480-84.