



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO  
EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

TÍTULO DEL TRABAJO

**“CUANTIFICACIÓN DE POLIGLUTAMATOS DE  
METOTREXATO EN ERITROCITOS EN DOSIS  
DIARIA Y SEMANAL PARA EL TRATAMIENTO DE  
PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**PRESENTA**

QFB. ANA SOCORRO RODRÍGUEZ BÁEZ

**DIRECTOR:**

DRA. ROSA DEL CARMEN MILÁN SEGOVIA

**CO-DIRECTOR:**

DRA. SUSANNA EDITH MEDELLÍN GARIBAY

**ASESORES:**

DRA. SILVIA ROMANO MORENO

DR. CARLOS ABUD MENDOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO  
EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

TÍTULO DEL TRABAJO

**“CUANTIFICACIÓN DE POLIGLUTAMATOS DE  
METOTREXATO EN ERITROCITOS EN DOSIS  
DIARIA Y SEMANAL PARA EL TRATAMIENTO DE  
PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**PRESENTA**

QFB. ANA SOCORRO RODRÍGUEZ BÁEZ

**DIRECTOR:**

DRA. ROSA DEL CARMEN MILÁN SEGOVIA

**CO-DIRECTOR:**

DRA. SUSANNA EDITH MEDELLÍN GARIBAY

**ASESORES:**

DRA. SILVIA ROMANO MORENO

DR. CARLOS ABUD MENDOZA

## PROYECTO REALIZADO EN:

Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. Registro: **70-18**

Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Registro: **CEID-2018012**.



El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro **003382**, nivel en desarrollo.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **628340**

## DEDICATORIA

***A mi abuelo***, gracias por inculcarme el amor por la química.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, quienes han sido mi apoyo durante cada etapa de mi vida, los cuales han sido un ejemplo para mí y me han enseñado cada uno de los valores que me impulsan a ser la persona que soy en día. Por mostrar entusiasmo y paciencia en los ensayos de mis presentaciones o al hablar de mis proyectos.

A mi directora de tesis, la Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia por su asesoramiento, apoyo y confianza proporcionada a lo largo de mi formación académica, así como, durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Susanna Edith Medellín Garibay por su disponibilidad para orientarme, aconsejarme y ayudarme a resolver mis dudas, así como por sus consejos tanto académicos como personales. Por su confianza, amistad y enseñarme cosas nuevas durante los últimos 2 años.

A la M.C. Ana Patricia Huerta García gracias a su apoyo, compromiso y dedicación fue posible llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Carlos Abud Mendoza y al Dr. Marco Martínez Martínez por ser el vínculo en la búsqueda e incorporación de pacientes, haciendo posible llevar a cabo este proyecto.

De una manera muy especial, le agradezco a la Dra. Lourdes Baranda y a Esmeralda por su amistad, compromiso e interés contribuyendo a la elaboración de esta investigación.

A los residentes de la unidad de Reumatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”; al equipo de trabajo del laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética, en particular a la QFB. Cristian Jazmín Rodríguez Pinal; quienes de alguna manera participaron o estuvieron involucrados en el desarrollo de este proyecto.

A todos los pacientes que colaboraron e hicieron posible la realización de este estudio.

A la M.C. Patricia Hernández Mitre, por su confianza y amistad desde mi llegada al laboratorio de Biofarmacia, generando un ambiente agradable y divertido; además agradezco a la Sra. Patricia Mitre por su amabilidad, invitaciones a comer y su confianza durante este tiempo.

A mis amigas Sabine, Jime y Marielena por su amistad incondicional y por su apoyo en las decisiones y etapas más importantes de mi vida.

A Raúl, Salvador y Alberto.

**Gracias.**

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1. Tratamiento.....	8
2.2. Metotrexato.....	8
2.3 Esquema de dosificación de MTX.....	9
2.4 Farmacocinética del MTX.....	10
2.5 Mecanismo de acción MTX.....	11
2.6 MTX-PGn y su cuantificación intracelular.....	12
2.7 Dosis semanal y dosis cotidiana de MTX para tratamiento de la AR.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS .....	19
5. OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
6.1 Lugar de realización del estudio.....	20
6.2 Criterios de selección de pacientes.....	20
6.3 Método de aleatorización del estudio.....	20
6.4 Administración de MTX.....	21
6.5 Evaluación clínica de los pacientes .....	21
6.6 Recolección de muestras sanguíneas.....	22
6.7 Proceso de extracción de MTX-PG3 y MTX-PG5 .....	22
6.8 Análisis Cromatográfico.....	23
6.9 Validación del método analítico.....	24
6.10 Análisis Estadístico.....	25
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26

7.1 Características de los pacientes con AR. ....	26
7.2 Seguimiento de pacientes con AR bajo tratamiento con MTX. ....	27
7.3 Evaluación de la temporalidad del tratamiento con la eficacia clínica del MTX. ....	29
7.4 Asociación de eventos adversos con la temporalidad del tratamiento. ....	34
7.5 Cuantificación de las concentraciones de MTX-PG3 y MTX-PG5 por UPLC-MS/MS. .....	36
7.6 Cuantificación intraeritrocitaria de MTX-PG3 y MTX-PG5 en muestras de pacientes con AR bajo tratamiento con MTX. ....	40
7.7 Efecto de la temporalidad del tratamiento sobre las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3. ....	42
7.8 Influencia del índice de masa corporal sobre las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3. ....	43
7.9 Remisión de la enfermedad. ....	44
8. CONCLUSIONES .....	47
9. REFERENCIAS .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Estructura química del ácido fólico (superior) y del MTX (inferior).....	9
<b>Figura 2.2</b> Mecanismo de acción del MTX. ....	12
<b>Figura 6.1</b> Proceso general de extracción para la cuantificación intraeritrocitaria de MTX-PG3 y MTX-PG5.....	23
<b>Figura 7.1</b> Seguimiento de los pacientes con AR durante el estudio. ....	28
<b>Figura 7.2</b> Evaluación de la temporalidad del tratamiento con la eficacia clínica del MTX [(A) Número de articulaciones inflamadas, (B) número de articulaciones dolorosas]. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico. ....	30
<b>Figura 7.3</b> Evaluación de la temporalidad del tratamiento con la eficacia clínica del MTX [(C) EVA, (D) DAS28]. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico. ....	32
<b>Figura 7.4</b> Evaluación de la temporalidad del tratamiento y marcadores indirectos de inflamación en AR [(E) Leucocitos (células/ $\mu$ L) y (F) VSG (mm/h)]. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico. ....	34
<b>Figura 7.5</b> Eventos adversos con MTX registrados por temporalidad en todos los pacientes incluidos durante el desarrollo del estudio. ....	34
<b>Figura 7.6</b> Cromatograma de MTX-PG5 (izquierda) y MTX-PG3 (derecha). ....	37
<b>Figura 7.7</b> Curva de calibración de MTX-PG3 (a) y MTX-PG5 (b) en eritrocitos.....	37
<b>Figura 7.8</b> Concentraciones eritrocitarias de MTX-PG3 (nM) vs tiempo (semanas), de acuerdo con la temporalidad del tratamiento con MTX en pacientes con AR. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico.....	40
<b>Figura 7.9</b> Concentraciones eritrocitarias de MTX-PG3 (nM) vs tiempo (semanas), de acuerdo con el IMC. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico. ....	44
<b>Figura 7.10</b> Evolución clínica con base a la diferencia del DAS28 por temporalidad del tratamiento con MTX después de 12 semanas en pacientes con AR.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 6.1</b> Evaluación clínica <sup>(17)</sup> .....	21
<b>Tabla 7.1</b> Características antropométricas y clínicas de los pacientes bajo temporalidad cotidiana y semanal al inicio del estudio.....	26
<b>Tabla 7.2</b> Principales eventos adversos asociados a MTX n=14.....	35
<b>Tabla 7.3</b> Concentraciones recuperadas en la curva de calibración para la cuantificación de MTXPGn en eritrocitos.....	38
<b>Tabla 7.4</b> Límite de detección y cuantificación MTX-PG3 y MTX-PG5.....	38
<b>Tabla 7.5</b> Precisión y exactitud del método analítico.....	38
<b>Tabla 7.6</b> Concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 (nM) en pacientes con AR.....	40
<b>Tabla 7.7</b> Resultados generales.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AINE:** Antiinflamatorios no esteroideos

**ATIC:** 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido formiltransferasa

**AR:** Artritis reumatoide

**ACR:** Colegio Americano de Reumatología

**QCB:** Control de concentración baja

**QCM:** Control de concentración media

**QCA:** Control de concentración alta

**DHF:** Dihidrofolato reductasa

**EVA:** Escala visual análoga

**HCIMP:** Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

**DAS28:** Índice de actividad de la enfermedad

**IMC:** Índice de masa corporal

**EULAR:** Liga Europea Contra el Reumatismo

**MTX:** Metotrexato

**csFARME:** Modificadores de la enfermedad convencionales

**bFarme:** Modificadores de la enfermedad sintéticos biológicos

**MTX-PGn:** Poliglutamatos de metotrexato.

**MTX-PG3:** Poliglutamato de metotrexato 3

**MTX-PG5:** Poliglutamato de metotrexato 5

**PCR:** Proteína C reactiva

**RFCC1:** Receptor de folatos

**TYMS:** Timidilato sintasa

**AICAR:** Ribonucleótido 5- aminoimidazol-4-carbozamida

**VSG:** Velocidad de sedimentación globular

## RESUMEN

El metotrexato (MTX) es el fármaco de elección en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR). Al interior de los eritrocitos, el MTX se une a residuos de glutamato, siendo el poliglutamato 3 (MTX-PG3) y el poliglutamato 5 (MTX-PG5) los más representativos, ya que se han asociado a la eficacia del tratamiento y a la presencia de eventos adversos, respectivamente. La dosis inicial de MTX es de 12.5 mg/semana con la finalidad de reducir oportunamente el índice de actividad de la enfermedad (DAS28). En el Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" (HCIMP) se divide la dosis total semanal en dosis diarias para disminuir los efectos adversos y aumentar la adherencia al tratamiento; sin embargo, hace falta información acerca de los niveles de MTX-PGs y su relación con la eficacia y la toxicidad de la administración diaria de MTX frente a la administración única semanal.

El objetivo de este trabajo fue comparar los niveles intraeritrocitarios de MTX-PG3 y MTX-PG5 a las 6, 12 y 24 semanas posteriores al inicio del tratamiento diario o semanal con MTX en pacientes con AR, así como evaluar la evolución clínica y la presencia de eventos adversos en ambos grupos.

Se realizó un estudio controlado aleatorizado, aprobado por el Comité de Ética en Investigación del HCIMP (70-18) y por el CEID de la FCQ-UASLP (2018012). Se incluyó un total de 92 pacientes de recién diagnóstico con AR. Los pacientes fueron aleatorizados en dos grupos: 1) 45 pacientes con dosis diaria de 2.5 mg y 2) 47 pacientes con dosis única semanal de 12.5 mg. Se obtuvo una muestra de 4 mL de sangre venosa periférica 24 h postdosis a las 6, 12 y/o 24 semanas después de iniciar el tratamiento con MTX. Los niveles intraeritrocitarios de MTX-PG3 y MTX-PG5 fueron determinados por UPLC-MS/MS. Adicionalmente, se evaluaron marcadores de la actividad de la AR mediante el DAS28, la escala visual análoga (EVA) y el número de articulaciones dolorosas e inflamadas, así como la presencia de eventos adversos.

El 50% de los pacientes completó el estudio (62% del esquema diario y 38% del semanal). En ambos regímenes, se observó una amplia variabilidad en la evolución clínica y en las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3. El MTX-PG5 presentó concentraciones inferiores al límite de detección (0.27 nM). No se registraron diferencias significativas entre tratamientos a pesar de la disminución de las articulaciones inflamadas y dolorosas ( $p=0.950$ ;  $p=0.731$ ), de la evolución del dolor ( $p=0.244$ ) y del DAS28 ( $p=0.779$ ) con ambos esquemas de dosificación. Aunque la incidencia de eventos

adversos fue mayor en la dosis semanal, tampoco se registraron diferencias entre tratamientos ( $p=0.387$ ). Los niveles de MTX-PG3 en la dosis semanal fueron mayores con respecto a la dosis diaria, sin diferencias significativas ( $p=0.175$ ). Los niveles intraeritrocitarios de MTX-PG3 presentaron diferencias ( $p=0.01$ ) en la semana 24 entre pacientes con normopeso [mediana (rango) de 372.7 (209.3-694.4) nM] y aquellos con sobrepeso u obesidad [84.45 (31.3-266.2) nM], lo que podría asociarse con el menor porcentaje de pacientes con IMC  $>25$  kg/m<sup>2</sup> en remisión a las 24 semanas ( $p=0.01$ ).

En cuanto a la evolución clínica y los niveles eritrocitarios de MTX-PG3, la administración diaria y semanal de MTX ofrecieron resultados similares. Sin embargo, con la dosis cotidiana se registró menor frecuencia de eventos adversos, lo que puede favorecer la adherencia al tratamiento en pacientes con diagnóstico reciente de AR.

**Palabras clave:** Metotrexato, poliglutamato 3, poliglutamato 5, índice de actividad de la enfermedad, dosis cotidiana, dosis semanal.

## ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is the first-line drug for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). Inside red blood cells, MTX binds to glutamate residues; polyglutamate 3 (MTX-PG3) and polyglutamate 5 (MTX-PG5) have been reported the most representative, as they have been associated with treatment efficacy and the presence of side effects<sup>1</sup>. The initial dose of MTX is 12.5 mg per week in order to reduce the disease activity index (DAS28) during the first 12 weeks<sup>2</sup>. In the Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” (HCIMP) the total weekly dose is divided into daily doses to reduce the side effects and increase adherence to treatment. However, it is necessary more information about MTX-PG levels and its association with the efficacy and toxicity of daily administration of the drug versus weekly single administration. The aim of this study was to compare the red blood levels of MTX-PG3 and MTX-PG5 at 6,12 and 24 weeks after the start of daily or weekly treatment with MTX in patients with RA. This was a randomized controlled study, approved by the ethics committee of the HCIMP (70-18) and by the CEID of the FCQ-UASLP (2018012). A total of 92 newly diagnosed patients with RA were included. The patients were randomized into two groups: 1) 45 patients with a daily dose of 2.5 mg and 2) 47 patients with a single weekly dose of 12.5 mg. A sample of 4 mL peripheral venous blood was obtained 24 h postdose at 6, 12 and / or 24 weeks after starting MTX treatment. The red blood levels of MTX-PG3 and MTX-PG5 were determined by UPLC-MS/MS. Additionally, markers of RA activity were evaluated using DAS28, the visual analog scale (EVA) and the number of tender painful and swollen joints, as well as the presence of side effects.

Only 50% of patients completed the study (62% of the daily scheme and 38% of the weekly dose). In both regimens, a wide variability was observed in the clinical evolution and the red blood concentrations of MTX-PG3. MTX-PG5 concentrations was below the limit of detection (0.27 nM). There were no significant differences between treatments despite the decrease swollen and tender joints ( $p=0.950$ ;  $p=0.731$ ), the evolution of pain ( $p=0.244$ ) and the DAS28 ( $p=0.779$ ) with both schemes. Although the incidence of side effects was higher in the weekly dose, there were no differences between treatments ( $p=0.387$ ). MTX-PG3 levels in the weekly dose were higher with respect to the daily dose, without significant differences ( $p=0.175$ ). The red blood levels of MTX-PG3 showed differences ( $p=0.01$ ) at week 24 between patients with normal weight [median (range) of 372.7 (209.3-694.4) nM] and those with overweight or obesity [84.45 (31.3-266.2) nM ],

which could be associated with the lowest percentage of patients with BMI>25 kg/m<sup>2</sup> in remission at 24 weeks ( $p = 0.01$ ).

Regarding the clinical evolution and red blood levels of MTX PG3, the daily and weekly administration of MTX offers similar results. However, with the daily dose there was a lower frequency of side effects, which favors adherence to treatment in patients with a newly diagnostic of RA.

**Key words:** Methotrexate, polyglutamate 3, polyglutamate 5, disease activity index, daily dose, weekly dose.

## 1. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad, autoinmune, crónica y multisistémica de etiología desconocida, considerada como la artropatía inflamatoria más frecuente <sup>(1)</sup>.

La incidencia anual de la enfermedad es alrededor de 40 casos por cada 100,000 habitantes y afecta del 0.2 al 2% de la población a nivel mundial, de acuerdo con lo reportado por Alam y cols. en el año 2017 <sup>(2)</sup>. A nivel nacional presenta una prevalencia de 1.6%, mientras que, en el estado de San Luis Potosí se ha reportado que 2.6% de la población padece AR <sup>(3, 4)</sup>. La AR es más frecuente en mujeres, en una relación de 3:1 con respecto a los hombres, e inicia a una edad entre los 30 y 50 años<sup>(5)</sup>. El riesgo a desarrollar AR aumenta hasta 50% ante la presencia de ciertos factores genéticos. Entre los factores ambientales, destacan el tabaquismo, alcoholismo, el uso de anticonceptivos orales y el estatus socioeconómico como potenciales factores de riesgo para el desarrollo de AR <sup>(1, 6)</sup>.

La AR constituye un problema de salud pública puesto que algunos pacientes presentan patrones monocíclicos o policíclicos de remisión favoreciendo la destrucción articular, discapacidad y deterioro de la calidad de vida. Adicionalmente, incrementa el riesgo de desarrollar complicaciones sistémicas que favorecen el aumento de mortalidad, asociado principalmente a enfermedad cardiovascular <sup>(7)</sup>. Lo anterior tiene un alto costo económico, individual, familiar, social y psicológico en quienes la padecen <sup>(8)</sup> por lo que es indispensable realizar un seguimiento continuo de los pacientes con AR hasta alcanzar una respuesta clínica significativa.

El objetivo terapéutico de la AR es la remisión de la enfermedad que consiste en la disminución del dolor e inflamación y la prevención del daño estructural; para ello se emplean criterios que permiten definir la presencia o ausencia de enfermedad. Para determinar el índice de actividad de la enfermedad se emplea el DAS28 que consiste en el conteo del número de articulaciones dolorosas e inflamadas (máximo 28), así como de otros marcadores de inflamación tales como velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteína C reactiva (PCR) y la evaluación visual del dolor descrita por el paciente (EVA) <sup>(9)</sup>.

Con la finalidad de disminuir la actividad de la enfermedad Para el tratamiento de la AR con fines de remisión de esta enfermedad se emplean diversos tipos de fármacos entre los que se encuentra el metotrexato (MTX), el cual es considerado como el “estándar de

oro” por su efecto sostenido, eficacia y bajo costo. De acuerdo con el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR), se recomienda la administración semanal de MTX con una dosis inicial de 12.5 mg e incrementos progresivos de 2.5 mg hasta alcanzar una dosis de mantenimiento  $\leq 25$  mg/semana con base a la respuesta y toxicidad observada en el paciente <sup>(10)</sup>. La respuesta terapéutica se empieza a obtener durante las primeras 3 a 6 semanas de tratamiento.

El MTX se distribuye en todo el organismo incluyendo el interior de hepatocitos, linfocitos, sinoviocitos y eritrocitos. Ejerce su acción a nivel celular, ya que por transformación metabólica se convierte a poliglutamatos de metotrexato (MTX-PGn), metabolitos asociados a la eficacia y efecto sostenido <sup>(10)</sup>. El poliglutamato de metotrexato 3 (MTX-PG3) destaca por ser el metabolito más abundante y el que mantiene relación con el efecto farmacológico, mientras que el poliglutamato de metotrexato 5 (MTX-PG5) está asociado con la aparición de eventos adversos <sup>(11, 12)</sup>.

La pauta habitual de administración del MTX por vía oral es semanal para el tratamiento de la AR. La dosis semanal puede ir ascendiendo en función de la respuesta del paciente, sin embargo, dado que es un fármaco con un margen terapéutico estrecho y de uso crónico, el riesgo de toxicidad y de interacciones con otros medicamentos es elevado. Se estima que aproximadamente el 30% de los pacientes con AR en la temporalidad semanal administrada, presenta aparición de eventos adversos, entre los cuales figuran las reacciones a nivel hematológico, digestivo, hepático, renal, neurológico y pulmonar <sup>(13, 14)</sup>; algunos de los cuales pueden llegar a ser graves y comprometer la vida del paciente. Lo anterior ha obligado a que entre el 15 y 30% de los pacientes que presentan tales eventos adversos abandonen el tratamiento. Las poblaciones con mayor riesgo a toxicidad por MTX son pacientes obesos, diabéticos, o con hepatitis viral o alcohólica <sup>(6)</sup>. Debido a lo anterior, durante el tratamiento con MTX se requiere una cuidadosa monitorización clínica del desarrollo de eventos adversos, mediante el hemograma completo y pruebas de funcionamiento hepático, con una periodicidad semanal durante el primer mes de tratamiento, cada 2 semanas al segundo mes y finalmente de manera mensual posterior a los tres meses del inicio de la terapia <sup>(15)</sup>.

En las enfermedades reumáticas la pauta de administración habitual del MTX es semanal; sin embargo, este esquema es susceptible de errores por parte del personal de salud o incluso el mismo paciente. Existen reportes de errores relacionados a la medicación en

los que se documenta la administración diaria de la dosis total semanal de MTX, lo que ha ocasionado reacciones adversas graves e incluso la muerte del paciente <sup>(16)</sup>.

Con fines de lograr disminuir la presencia de eventos adversos o de los errores de medicación asociados al uso del MTX, así como mejorar la adherencia al tratamiento, se han planteado diversas estrategias, entre las cuales se encuentra la modificación del régimen de dosificación semanal por un régimen que permita la administración diaria de la dosis disminuida de MTX, pero sin comprometer su eficacia.

## 2. ANTECEDENTES

La AR representa el mejor ejemplo de alteración inflamatoria del sistema musculoesquelético, con alta prevalencia y alteración en la calidad de vida. Se caracteriza por presencia de sinovitis persistente y simétrica de las articulaciones, lo que afecta principalmente las articulaciones de hombros, rodillas, cadera y manos, y en algunos casos causa la destrucción del tejido articular y provoca erosiones óseas <sup>(2)</sup>.

Actualmente, los principales marcadores de actividad e inflamación en la AR son el DAS28, VSG, PCR y EVA <sup>(9)</sup>. El DAS 28 determina el índice de actividad a través del conteo del número de articulaciones dolorosas e inflamadas (máximo 28). El estado de remisión descrita por el DAS28 es el siguiente <sup>(9, 17)</sup>:

<b>Escala DAS28</b>	<b>Interpretación del puntaje</b>
<2.6	Remisión de la enfermedad
2.6-3.2	Actividad baja
3.2-5.1	Actividad moderada
>5.1	Actividad severa

### 2.1. Tratamiento.

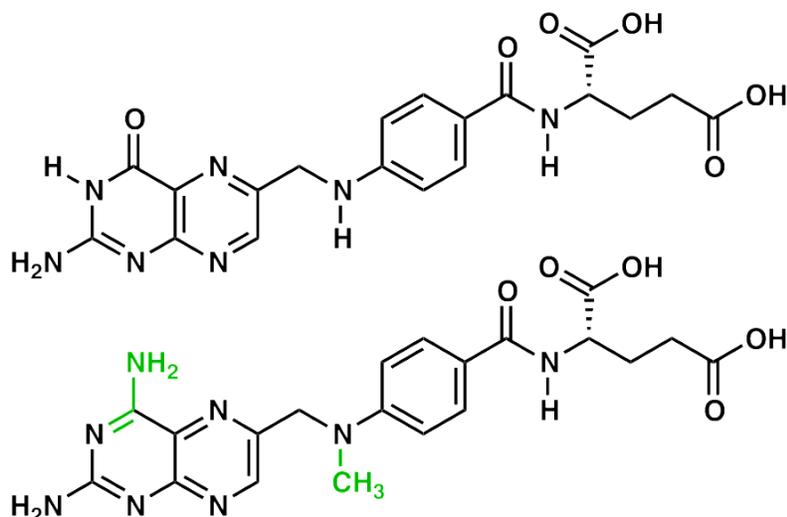
Para lograr el control de la inflamación e incrementar la posibilidad de remisión de la AR, en la actualidad se emplean múltiples fármacos, entre los que se incluyen antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides, fármacos modificadores de la enfermedad, ya sea sintéticos biológicos (bFARME) o convencionales (csFARME).

De acuerdo a la guía de ACR para el tratamiento de la AR, el objetivo del tratamiento es llegar a la remisión clínica de la enfermedad a las 12 semanas del tratamiento, efecto conocido como remisión temprana de la enfermedad <sup>(9)</sup>, no obstante, algunos pacientes presentan la remisión en tiempo posterior, llamado remisión tardía de la enfermedad, y un tercer grupo de pacientes puede presentar un aumento de la actividad inflamatoria posterior a la remisión definido como recaída <sup>(17)</sup>.

### 2.2. Metotrexato.

El MTX ha sido empleado en el tratamiento de la AR desde hace 40 años; hoy en día es considerado el csFARME más usado y de primera elección para el tratamiento de la enfermedad, debido al bajo costo, disponibilidad en el mercado, eficacia y efecto sostenido <sup>(18)</sup>.

Desde el punto de vista de su estructura química, el MTX es un análogo del ácido fólico (Figura 2.1). Se considera que ambos compuestos comparten la mayoría de las rutas de captación y metabolismo.



**Figura 2.1** Estructura química del ácido fólico (superior) y del MTX (inferior).

Tomado de Goicochea y cols. 2016

La administración concomitante del ácido fólico reduce la aparición de efectos secundarios y los niveles séricos de homocisteína, sin disminuir la eficacia de MTX, por lo que deben administrarse rutinariamente al día siguiente de iniciado el tratamiento con este fármaco <sup>(15)</sup>.

### 2.3 Esquema de dosificación de MTX.

Las dosis de MTX para el tratamiento de la AR surgieron a partir del esquema de dosificación propuesto para el tratamiento de la psoriasis, el cual consiste en la administración del fármaco en una dosis única en la semana, esquema conocido como temporalidad semanal <sup>(19)</sup>. En comparación con las dosis de MTX empleadas en el tratamiento de neoplasias, las dosis para AR son bajas. En AR se administran 7.5 mg aumentando esta cantidad según la evolución del paciente, hasta alcanzar un total de 25 mg en la dosis semanal. La respuesta terapéutica es muy variable, pero en general se obtiene a partir de las primeras 3 a 6 semanas, sin embargo, puede observarse mejoría adicional hasta después de 12 semanas de tratamiento <sup>(2)</sup>.

## 2.4 Farmacocinética del MTX.

A partir de la administración oral de MTX, el fármaco se absorbe rápidamente en el intestino delgado alcanzando concentraciones plasmáticas máximas en 1.5 h <sup>(12)</sup>.

Tras un incremento de la dosis disminuye su absorción, y se alcanza una biodisponibilidad del 87% a partir de la administración de dosis de 6 a 10 mg bien de 30 a 70% con dosis de 15 a 30 mg, lo que genera concentraciones plasmáticas máximas en un intervalo de 0.3 a 1.6  $\mu\text{mol/L}$  en un tiempo de 0.75 a 2 h <sup>(13)</sup>. La biodisponibilidad del MTX por vía oral varía considerablemente entre individuos; dicho parámetro declina cuando la dosis se incrementa, aspecto atribuido al hecho que el proceso de absorción gastrointestinal es mediado por un transportador activo receptor de folatos (RFC1), el cual es de capacidad limitada y saturable <sup>(13, 20)</sup>.

Una vez absorbido, el MTX se une a la albúmina plasmática aproximadamente entre el 30 al 70%; su volumen de distribución aparente es de 0.87 a 1.43 L/Kg.

El MTX es metabolizado por 3 diferentes vías: primero el fármaco presenta un bajo efecto de primer paso, para ser convertido entre 7 a 10% a 7-hidroxi-metotrexato a través de la enzima aldehído oxidasa; posteriormente menos del 5% de la dosis del fármaco es metabolizado por bacterias de la microbiota gastrointestinal lo que da lugar al metabolito inactivo 4-amino-desoxi-N<sup>10</sup>-metilpterico. Paralelamente, ocurre la conversión intracelular del MTX en MTX-PGn, considerada la vía metabólica más importante del fármaco <sup>(13)</sup>.

A través de un sistema de transporte activo RFC1, el MTX se introduce a los hepatocitos, linfocitos, sinoviocitos y eritrocitos para ser metabolizado a MTX-PGn. Los MTX-PGn pueden tener incorporados hasta 6 residuos de moléculas de glutamato (MTX-PG<sub>1-6</sub>), los cuales se distinguen por ser de cadena corta o de cadena larga <sup>(20)</sup>. En la producción de poliglutamatos, los MTX-PG1 a MTX-PG5 representan el 99.6% de la totalidad de los MTX-PGn. El más abundante es el MTX-PG3, mientras que el MTX-PG5 está asociado a la aparición de eventos adversos <sup>(11, 12)</sup>.

Debido a su gran tamaño, los MTX-PGn permanecen en el interior celular; sin embargo, mediante una reacción competitiva, la enzima gama-glutamil hidrolasa (GGH) remueve los residuos de glutamato añadidos, y de esta manera el fármaco regresa a su forma de monoglutamato (MTX-PG) para ser transportado al exterior celular, disponible para su eliminación.

La principal ruta de eliminación del MTX la constituye la vía renal con un aclaramiento del 65 a 80% del fármaco inalterado y 20% mediante excreción biliar, con un tiempo de vida media de eliminación de 7 a 10 h <sup>(10, 13)</sup>, sin embargo, los metabolitos poliglutamados MTX-PG3 y MTX-PG5 tienen un extenso tiempo de vida media de eliminación de 4.3 y 2.1 semanas, respectivamente <sup>(12, 21)</sup>.

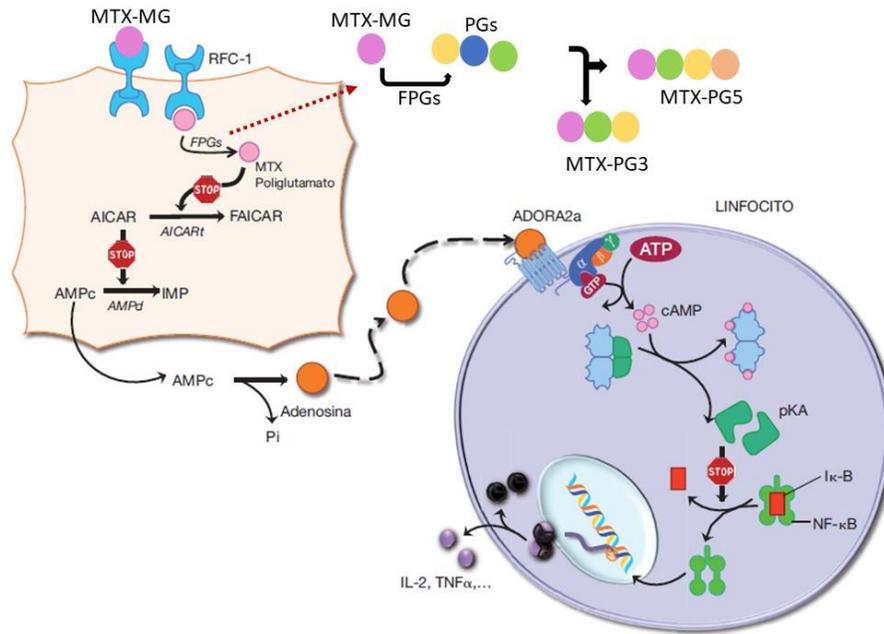
A pesar de varias décadas del uso de MTX, el conocimiento de su farmacocinética es limitado, y la información que se tiene documentada presenta una amplia variabilidad inter-sujeto <sup>(22)</sup>.

## **2.5 Mecanismo de acción MTX.**

Entre las principales células diana del MTX se encuentran los hepatocitos, sinoviocitos, linfocitos y eritrocitos. <sup>(22)</sup>

No se ha determinado con exactitud el mecanismo de acción en esta enfermedad, pero se han descrito diversas acciones antiproliferativas, antiinflamatorias e inmunorreguladoras que pueden contribuir a su efecto terapéutico.

Los MTX-PGn generan la inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa (DHF), la cual cataliza el paso de dihidrofolato a tetrahidrofolato, para desencadenar la acumulación de fosfatos oxidados, lo que bloquea la síntesis *de novo* de pirimidinas. De igual manera, los MTX-PGn influyen en la síntesis *de novo* de purinas al inhibir tanto a la enzima timidilato sintasa (TYMS) como a la enzima 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido formiltransferasa (ATIC), y provocan un aumento de los niveles intracelulares de ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR). A su vez, el aumento intracelular de AICAR tiene potentes efectos inhibidores en dos enzimas implicadas en el catabolismo de adenosina, que son AMP desaminasa y AMP deaminasa, hecho que genera la acumulación intracelular de nucleótidos de adenosina. La célula expulsa el exceso de adenosina, que actúa como agente anti-inflamatorio mediante receptores específicos, en concreto los de tipo A2. La adenosina actúa al inhibir la formación de anión superóxido presente en procesos inflamatorios, reduce la síntesis de citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$  IL-6, IL- 8, IL-17 y estimula la síntesis de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 en monocitos y macrófagos <sup>(23, 24)</sup> (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Mecanismo de acción del MTX. Tomado de Goicochea y cols. 2016

### 2.6 MTX-PGn y su cuantificación intracelular.

No se ha encontrado una correlación entre las concentraciones séricas o plasmáticas de MTX y la actividad de la AR <sup>(10, 22, 25)</sup>. Recientes estudios han sugerido que la cuantificación de los MTX-PGn en los glóbulos rojos es representativa de las concentraciones en otras células tales como los linfocitos; además, dichas concentraciones se pueden asociar con la respuesta terapéutica, es decir, con el efecto antiinflamatorio<sup>(22)</sup>.

La medición de MTX-PGn en el organismo a nivel intracelular ha sido posible gracias a la aplicación de metodologías analíticas muy sensibles tales como UPLC acoplada en tándem a un detector de masas (UPLC-MS/MS), para medir concentraciones tan bajas en el orden nano molar (nM) <sup>(25)</sup>.

Aunque es discutible la asociación entre los niveles de MTX-PGn con el efecto antiinflamatorio, se ha encontrado que los pacientes con niveles totales de MTX-PGn por arriba de 60 nM presentan mejor beneficio terapéutico que los pacientes con menores concentraciones a ésta <sup>(20)</sup>. No obstante, hay una considerable variabilidad intra-sujeto en los datos de concentraciones reportadas para estos metabolitos en diversos estudios clínicos.

La reacción de poliglutamación es muy lenta y los MTX-PGn formados van apareciendo en los eritrocitos de manera paulatina según se van agregando moléculas de glutamato (Figura 2.2). Su acumulación se lleva a cabo mediante la formación intracelular de los MTX-PGn, los cuales son eliminados mediante una reacción competitiva, la enzima gamma-glutamil hidrolasa (GGH) remueve los residuos de glutamato añadidos, y de esta manera el fármaco regresa a su forma de monoglutamato para ser transportado al exterior celular, disponible para su eliminación. Se han detectado concentraciones del MTX-PG3 a partir de las 3 semanas y del MTX-PG5 desde la semana 7 de tratamiento con MTX. Dalrymple y cols., (2008) han señalado que el MTX-PG3 tarda 41 semanas en alcanzar el equilibrio dinámico, mientras que el MTX-PG5 lo hace en 140 semanas<sup>(22)</sup>. La concentración de MTX-PGn aumenta a medida que aumenta la dosis semanal hasta 15 mg y después se estabiliza<sup>(13)</sup>.

Desde una perspectiva clínica, una respuesta favorable al tratamiento podrá observarse entre las semanas 6 y 12 por lo que se ha discutido la necesidad de escalar las dosis semanales con incrementos paulatinos para obtener los beneficios del tratamiento oportunamente, aunque esta alternativa tiene la desventaja de disminuir la biodisponibilidad del MTX y aumentar la probabilidad del desarrollo de eventos adversos<sup>(20)</sup>.

A mayores niveles de MTX-PGn los pacientes presentan mejorías con base al resultado del DAS28. Así, por ejemplo, Murosaki y cols., (2016). encontraron mayores concentraciones de MTX-PGn en pacientes que presentaron una diferencia de DAS28 >1.2 a las 24 semanas del tratamiento con respecto a aquellos pacientes que registraron ≤1.2 en dicho valor clínico. Los autores observaron una correlación entre las dosis de MTX con las concentraciones de MTX-PG3, MTX-PG4 y MTX-PG5, excepto para las MTX-PG1 y MTX-PG-2<sup>(26)</sup>. Así mismo, Takahashi, Kaneko y cols., (2017) obtuvieron una asociación entre los niveles de MTX-PG3 con el DAS28 a las 8, 24 y 36 semanas. Mediante el análisis ROC (Receiver Operating Characteristic Curve), estos autores encontraron que una concentración intraeritrocitaria  $\geq 83$  nM de MTX-PGn a las 12 semanas aumenta las probabilidades de disminuir  $\geq 1.2$  puntos el DAS28 en la semana 24. La concentración media de MTX-PGn reportada a las 24 semanas para el grupo de pacientes en remisión fue de 109.1 nM<sup>(27)</sup>.

Por otro lado, debido a la amplia variabilidad inter-paciente en las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PGn, varios autores han propuesto realizar estudios enfocados

a los genes involucrados en la codificación de las enzimas y transportadores que participan en el mecanismo de acción y en el metabolismo de MTX. Los polimorfismos de los genes que codifican a dichas enzimas y transportadores son capaces de influir en la actividad y en la farmacocinética y, en consecuencia, en las concentraciones de estos metabolitos a nivel intracelular<sup>(28)</sup>.

Por lo anterior, debido a la amplia variabilidad interindividual en las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PGn y su asociación con la respuesta al tratamiento, es necesario cuantificar los MTX-PGn como biomarcadores para definir un régimen terapéutico óptimo en el tratamiento de la AR<sup>(10)</sup>.

### **2.7 Dosis semanal y dosis cotidiana de MTX para tratamiento de la AR.**

Se ha realizado un gran número de estudios clínicos con el objetivo de buscar alternativas para optimizar la terapia con MTX para el tratamiento de la AR, aunque son escasos aquéllos que evalúan el método de dosificación semanal y las limitaciones que puede presentar para lograr una remisión adecuada de la enfermedad <sup>(19, 29, 30)</sup>.

Aunque la administración semanal de MTX se considera adecuada en la mayoría de los casos, se tienen registros de diversos problemas de cumplimiento y apego al tratamiento hasta en 53% de los pacientes, ya sea por olvido o administración de menor dosis, o debido a la suspensión del medicamento al sentir mejoría, o por la presencia de efectos adversos, entre otras causas <sup>(10)</sup>.

Como parte de los problemas por efectos adversos, se registran síntomas generales como mareos, fatiga, fiebre y pérdida de peso, e incluso se han reportado alteraciones gastrointestinales como dolor abdominal, diarrea, mucositis o estomatitis. Los principales desórdenes hematológicos que se pueden presentar son leucopenia, trombocitopenia y pancitopenia. La hepatotoxicidad es el principal problema de la terapia con bajas dosis de MTX <sup>(13)</sup>, dado que se ha reportado que la administración semanal de éste, induce una elevación importante de las transaminasas hepáticas (ALT y/o AST > 100 U/L) <sup>(14)</sup>.

Desde el punto de vista de distribución de medicamentos en el ámbito hospitalario, los problemas de prescripción y de transcripción de la dosis de MTX por parte de personal médico, farmacéutico o de enfermería, son una realidad, lo que maximiza el riesgo de provocar errores graves de medicación. En lugar de administrar este fármaco en periodos semanales, se ha llegado a cometer el error de medicación de ofrecerlo diariamente a los pacientes, ya que, en general, tanto el personal de salud como los pacientes se

encuentran acostumbrados a seguir un esquema de dosificación diaria en varios tipos de fármacos <sup>(16, 31)</sup>. Este tipo de errores generan graves problemas de toxicidad que favorecen el desarrollo de serios eventos adversos, incluyendo el fallecimiento de pacientes <sup>(32)</sup>.

Como una propuesta a la resolución de los problemas antes señalados, ha surgido la alternativa de administrar el MTX en un esquema de dosis diaria en cantidades que resultan de repartir la dosis total semanal en dosis menores cada día de la semana. Lo anterior pretende fundamentalmente, minimizar efectos adversos, mejorar la adherencia al tratamiento y disminuir el riesgo de sobredosificación, sin comprometer la eficacia antiinflamatoria del fármaco <sup>(29)</sup>. Además de manera indirecta se aprovecharía la mayor biodisponibilidad que se obtendría con dosis divididas en comparación con una dosis total del MTX, lo cual, como ya se mencionó, a dosis mayores se disminuye la fracción absorbida del fármaco <sup>(33)</sup>.

Kremer, Davies y cols., (1995) evaluaron el efecto de la modificación del esquema de dosificación del tratamiento en pacientes con AR a los 8 meses de tratamiento con MTX y sin prescripción de otro csFARME. Antes de las 12 semanas, 48% de los pacientes que recibieron MTX cada 2 semanas y sólo 12.5% de pacientes de dosis semanal presentaron recaída de la enfermedad. Además, hubo mayor disminución del número de articulaciones dolorosas a las 6 y 18 semanas en el grupo semanal, sin embargo, no se encontró diferencia significativa en el número de articulaciones inflamadas, articulaciones dolorosas, EVA y pruebas de laboratorio (biometría hemática, creatinina sérica, proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular y albúmina), al comparar con el grupo de dosificación de menor frecuencia (una administración cada 2 semanas) <sup>(30)</sup>.

Resultados similares encontraron Magdalena, Pacheco y cols., (1999), al evaluar pacientes con AR bajo tratamiento semanal y cada 2 semanas con MTX durante 9 meses y con remisión de la enfermedad por un periodo  $\geq 6$  meses. Solamente 8% de los pacientes con dosis cada 2 semanas y 5% con dosis semanal no remitieron la enfermedad después de 24 meses. No se encontró diferencia significativa entre las variables clínicas y de laboratorio entre ambos grupos; sin embargo, los niveles de transaminasas hepáticas fueron menores en el grupo con dosis cada 2 semanas con respecto al grupo con dosis semanal de MTX ( $p=0.041$ ) <sup>(19)</sup>.

En otro estudio, se modificó el tratamiento semanal de dosificación de MTX en pacientes con AR administrando la dosis dos veces a la semana. Con relación a este esquema, Pandya y cols., (2002) encontraron que, a las 8 semanas, el número de articulaciones dolorosas fue menor con dosis dos veces a la semana al comparar con el grupo con dosis semanal de MTX; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a las 4, 12 y 16 semanas. La evaluación global del paciente fue mejor bajo dosificación dos veces a la semana (media  $\pm$  desviación estándar;  $2.35 \pm 3.23$  vs  $4.29 \pm 2.80$ ) pero no sucedió lo mismo con el valor de EVA ya que fue mayor en este grupo ( $47.18 \pm 18.6$  vs  $36.79 \pm 21.54$ ) con respecto a la dosificación semanal. A las 8 semanas, 70.5% de los pacientes con dosis semanal presentó mejoría contra 68.75% de pacientes con dosificación dos veces a la semana, pero en la semana 16 el porcentaje de mejoría obtenido fue de 72.4% y 79.2%, respectivamente. Finalmente, solo 5 pacientes de 39 en dosis semanal y 5 pacientes de 41 en dosis dos veces a la semana de MTX tuvieron una leve elevación ( $>80$  U/L) de las transaminasas hepáticas (ALT y AST) <sup>(29)</sup>.

Lo anterior sugiere que la modificación del esquema semanal de MTX no compromete la eficacia clínica en el paciente con AR siempre y cuando no se modifique la dosis total<sup>(19, 29, 30)</sup>. Actualmente, en la Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” (HCIMP) se utiliza de manera empírica la administración diaria en dosis bajas de MTX, con la finalidad de disminuir la frecuencia de errores de medicación y la presencia de eventos adversos, lo que supone mayor apego por parte del paciente con AR y la remisión oportuna de la enfermedad. Sin embargo, no existe información previa acerca de la seguridad y eficacia de este esquema sugerido por el grupo de médicos reumatólogos de la Unidad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El MTX es el fármaco de primera elección en el tratamiento como modificador de la enfermedad de AR, el cual produce amplia variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica en términos de eficacia y toxicidad; sólo el 50% de los pacientes responden de manera satisfactoria cuando es empleado en monoterapia debido a la frecuencia con que presenta efectos secundarios. De 10 a 30% de los pacientes pueden abandonar el tratamiento precisamente debido a los problemas de su toxicidad <sup>(15)</sup>.

Aunque el MTX es de uso generalizado en la AR, hay diferencias entre la forma de establecer el esquema de dosis, la vía de administración y la forma de incrementar dichas dosis. De manera general, la temporalidad semanal es el esquema indicado para el tratamiento de la AR con MTX, la cual consiste en la administración de la dosis total en un solo día de la semana. A pesar de su eficacia, esta temporalidad ha presentado múltiples inconvenientes en su empleo, los cuales incluyen falta de adherencia al tratamiento por parte de los pacientes tanto hospitalizados como ambulatorios. El riesgo para cometer errores al administrar la dosis semanal como si fuera la dosis diaria, ha originado sobredosificación con MTX, con el grave aumento en el desarrollo de eventos adversos asociados al fármaco e incluso la muerte <sup>(16, 32)</sup>. Este riesgo puede llegar a ser mayor en pacientes de edad avanzada que presentan un aclaramiento renal disminuido <sup>(32)</sup>. Por estas razones, el MTX por vía oral, de uso no oncológico, debe considerarse como medicamento de alto riesgo en la cadena terapéutica de clínicas y hospitales <sup>(34)</sup>.

En la Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis del HCIMP se emplean las guías EULAR/ACR las cuales recomiendan como primera estrategia, el uso de MTX con dosis de inicio de 12.5 mg/semana para lograr la mejora por encima del 50% dentro de los primeros 3 meses y alcanzar el objetivo de mejora total en 6 meses <sup>(35)</sup>. Si la estrategia terapéutica falla, se recomienda la estratificación de la dosificación del tratamiento.

Por decisión de los médicos de la Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis del HCIMP con el fin de lograr la disminución de errores de medicación asociados al MTX, así como, reducir la presencia de eventos adversos <sup>(36)</sup>, el esquema de dosificación de MTX en AR consiste en administrar la dosis total semanal dividida en 5 a 7 días. Sin embargo, son escasos los reportes que documentan la seguridad y eficacia de este esquema de dosificación frente a la administración total semanal <sup>(29)</sup>, además no existen estudios que

asocien los niveles intraeritrocitarios de MTX-PGn y la respuesta al tratamiento dependiendo del esquema de dosificación.

Por tal motivo, el presente proyecto surgió a partir de la necesidad de determinar si no existe diferencia clínica en la temporalidad diaria o semanal en la administración del MTX, en cuanto a los niveles intraeritrocitarios de MTX-PGn y en desarrollo de efectos adversos en los pacientes con AR. La cuantificación de dichos niveles es posible dado que se dispone de la metodología analítica por UPLC-MS/MS en el Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

El conocimiento de lo anterior será la base para plantear adecuadas estrategias de dosificación que permitan mejorar la adherencia al tratamiento y garantizar la remisión de la enfermedad en los pacientes. Indudablemente que estas acciones permitirán que el paciente logre reincorporarse a sus actividades laborales y sociales y, sobre todo, mejorarán su calidad de vida.

#### **4. HIPÓTESIS**

No existen diferencias en los niveles eritrocitarios de MTX-PG3 y MTX-PG5 en pacientes con AR bajo tratamiento con MTX en dosis diaria comparada con la dosis semanal.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Comparar los niveles eritrocitarios de MTX-PG3 y MTX-PG5 entre pacientes con AR a los tres y seis meses posteriores al inicio de tratamiento diario o semanal de MTX.

##### **5.1 Objetivos Particulares**

1. Cuantificar los niveles de MTX-PG3 y MTX-PG5 en pacientes con AR en tratamiento con MTX en dosis diaria y semanal.
2. Comparar las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 y MTX-PG5 en el equilibrio dinámico en dosis diaria y semanal.

##### **5.2 Objetivos Secundarios**

1. Asociar la presencia de eventos adversos con las concentraciones de MTX-PGs en dosis diaria y semanal.
2. Comparar la eficacia del MTX en pacientes con recién diagnóstico de AR con dosis cotidiana y semanal.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio controlado aleatorizado durante el periodo de agosto de 2018 a junio de 2019, en el que se incluyeron pacientes con recién diagnóstico de AR en inicio de tratamiento con MTX.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del HCIMP con registro 70-18 y por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la FCQ-UASLP con registro CEID-2018012 (Anexo I).

### 6.1 Lugar de realización del estudio.

Unidad Regional de Reumatología y Osteoporosis del HCIMP y Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

### 6.2 Criterios de selección de pacientes.

Se incluyeron 92 pacientes con recién diagnóstico de AR basado en los criterios del ACR (Anexo II), con una edad entre 18 a 65 años. No se incluyeron pacientes con enfermedad hepática, renal o con otra enfermedad autoinmune. Se solicitó la firma del consentimiento informado de todos los pacientes que autorizaron su participación en el estudio.

### 6.3 Método de aleatorización del estudio.

Se realizó la aleatorización de manera consecutiva del tratamiento semanal o cotidiano con MTX hacia los pacientes, mediante una tabla de números aleatorios generada a través del paquete blockrand del programa R v.3.2.1.

El tamaño de la muestra se calculó con el propósito de evaluar la diferencia en las concentraciones de MTX-PGn de acuerdo con la temporalidad y se basó en la ecuación propuesta por Wong-McClure <sup>(37)</sup>.

$$n_0 = \frac{2(Z_\alpha + Z_\beta)^2 S^2}{d^2}$$

A partir del estudio realizado por Murosaki y cols. (2016) se estimó que la desviación estándar de las concentraciones de MTX-PGn fue de 30 nM y se estableció una diferencia media de 20 nM entre pacientes que lograron la remisión de la AR con base al valor de  $\Delta$ DAS28 <sup>(26)</sup>. Por lo tanto, para detectar diferencias de 25 nM con un nivel de confianza del 90% para una prueba de 2 colas ( $Z_\alpha=1.96$  y  $Z_\beta=1.64$ ) y una potencia estadística del 95%

( $1-\beta=0.95$ ), se estimó un mínimo de  $n_0=40$  pacientes en inicio de tratamiento con MTX por grupo.

Los pacientes fueron clasificados en dos grupos de la siguiente manera:

Grupo A: Pacientes en inicio de tratamiento con MTX en temporalidad cotidiana ( $n=45$ ).

Grupo B: Pacientes en inicio de tratamiento con MTX en temporalidad semanal ( $n=47$ ).

#### 6.4 Administración de MTX

Ambos grupos recibieron una dosificación inicial de 12.5 mg de MTX vía oral en comprimidos (cada comprimido contiene 2.5 mg del fármaco) de la siguiente manera:

Grupo A: 1 comprimido por día, durante 5 días de la semana.

Grupo B: 3 comprimidos por la mañana y 2 comprimidos por la noche, en un día de la semana.

De considerarse necesario un aumento de dosis durante las citas de seguimiento, los pacientes recibieron incrementos progresivos de 2.5 mg para ambos esquemas de dosificación. Adicionalmente, ambos grupos recibieron como tratamiento concomitante: 1 csFARME Azulfidina (15 mg/semana), Prednisona (2.5 mg/día), Ácido fólico (5 mg cada 3 días), Calcitriol (0.25 mcg/día), Meloxicam (7,5 mg/día) y Omeprazol (20 mg/día).

#### 6.5 Evaluación clínica de los pacientes

Los pacientes fueron valorados al inicio del estudio, a las 6, 12 y 24 semanas posteriores al inicio del tratamiento con MTX. Estas evaluaciones fueron realizadas por los médicos reumatólogos y consistieron en el conteo del número de articulaciones inflamadas y dolorosas (máximo 28), el registro EVA y la estimación del DAS28 (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1** Evaluación clínica <sup>(17)</sup>

Variable	Escala	Interpretación puntaje
EVA	0	Sin dolor
	20	Poco dolor
	40	Dolor moderado
	60	Dolor fuerte
	80	Dolor muy fuerte
	100	Dolor insoportable
DAS28	<2.6	Remisión de la enfermedad

2.6-3.2	Actividad baja
3.2-5.1	Actividad moderada
>5.1	Actividad severa

Además, durante estas evaluaciones se incluyeron estudios de laboratorio que consistieron en la VSG, PCR, biometría hemática, química sanguínea (creatinina sérica, glucosa, urea, fosfatasa alcalina, nitrógeno ureico (BUN) y pruebas de funcionamiento hepático (AST y ALT)). Con los resultados de estos estudios, así como la información proveniente del expediente clínico, en cada paciente se evaluó la aparición de eventos adversos gastrointestinales, hepatobiliares, respiratorios, anemia, leucopenia, reacciones cutáneas, etc. La hepatotoxicidad fue definida por niveles AST y/o ALT >40 U/L; mientras que valores de hemoglobina <12 g/dL se considera como un estado anémico y un conteo de glóbulos blancos < 6000 U/ $\mu$ L es indicativo de leucopenia.

#### **6.6 Recolección de muestras sanguíneas.**

A las 24 h post-dosis de la semana 6, 12 y 24 posteriores al inicio del tratamiento, se recolectaron 4 mL de sangre venosa periférica en un tubo vacutainer™ con EDTA. Las muestras fueron centrifugadas a 600 g durante 10 min a 4°C con la finalidad de obtener el plasma sanguíneo y lograr el aislamiento de los eritrocitos. A continuación, se realizó el lavado de los eritrocitos con solución salina al 0.9% en 2 ocasiones y se centrifugó a 600 g durante 10 min a 4°C por cada lavado. Los eritrocitos lavados se almacenaron a -80°C para su posterior análisis por UPLC-MS/MS.

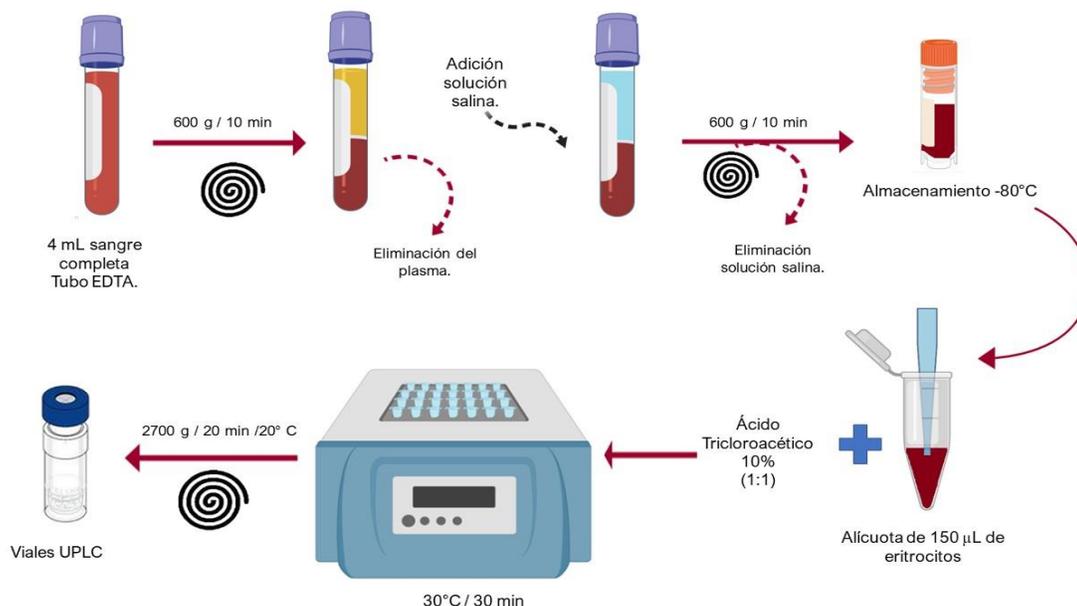
#### **6.7 Proceso de extracción de MTX-PG3 y MTX-PG5**

El stock inicial con estándares de MTX-PG3 y MTX-PG5 se preparó en hidróxido de amonio (0.1 M) en una concentración de 76.84  $\mu$ M y 63.36  $\mu$ M, respectivamente. A partir del stock inicial, se preparó un estándar de la mezcla de ambos MTX-PGn a una concentración de 500 nM.

La curva de calibración se preparó por dilución con 8 puntos en un intervalo de concentración de 1.95 a 500 nM. Los estándares de controles de calidad (QC) se elaboraron en 3 concentraciones baja (QCB), media (QCB) y alta (QCA) a 10 nM, 50 nM y 400 nM, respectivamente.

A partir del lavado de los eritrocitos, tanto los estándares como las muestras se procesaron de la siguiente manera:

Se tomó una alícuota de 150  $\mu\text{L}$  de muestra y se colocó en un tubo eppendorf, enseguida se agitó en vortex y lentamente se añadió ácido tricloroacético al 10% (1:1). Posteriormente se incubó durante 30 min a 30°C y se centrifugó a 2700 g durante 20 min a 20°C; el sobrenadante se recuperó y se colocó en un vial de vidrio, el cual debía permanecer una hora en el automuestreador del equipo UPLC a 10°C para su posterior análisis (Figura 6.1).



**Figura 6.1** Proceso general de extracción para la cuantificación intraeritrocitaria de MTX-PG3 y MTX-PG5.

### 6.8 Análisis Cromatográfico.

El análisis de las muestras se realizó en un equipo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS/MS) de la marca Waters. El equipo consta de un automuestreador con temperatura controlada, una bomba cuaternaria, horno para control de temperatura de la columna cromatográfica y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo Xevo TQD, marca Waters.

Para la separación cromatográfica se empleó una columna Waters Acquity UPLC HSS T3 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm x 100 mm) a una temperatura de 35°C. Se usó una fase móvil constituida por bicarbonato de amonio 10 mM (pH=7.5) en agua desionizada (A) y acetonitrilo grado masas (B). El sistema de bombeo fue en gradiente durante 2.5 minutos con 100% A, seguido de una disminución a 90% A durante 1.5 minutos para finalmente regresar a las

condiciones iniciales durante 2 minutos para el reacondicionamiento de la columna. La velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min, el volumen inyección de 40  $\mu$ L y la temperatura del automuestreador se ajustó a 10°C. El tiempo de retención del MTX-PG5 y MTX-PG3 fue de 3.23 y 3.76 min, respectivamente, con una duración total de 6 minutos por inyección. La información obtenida fue procesada con el software MassLynx V4.1.

La cuantificación de MTX-PG3 y MTX-PG5 se hizo empleando el modo de monitorización en reacción múltiples (MRM) y la sonda de electrospray operada en modo de iones positivos (ES+). Se llevó a cabo el análisis de infusión de un estándar en mezcla del MTX-PG3 y MTX-PG5 a una concentración de 500 nM con la finalidad de obtener las condiciones ideales para la identificación y caracterización de ambos MTX-PGn en el espectrómetro de masas.

Las condiciones estandarizadas para la detección y cuantificación de MTX-PGn fueron las siguientes: Voltaje del capilar 0.6 kV, temperatura de desolvatación 500 °C, flujo del gas de desolvatación 1000 L/h. Las transiciones monitoreadas fueron las siguientes: MTX-PG3 (ión molecular – fragmentos, m/z) 712.3 – 308.05 y 712.3 – 174.99, (energía de colisión de 36 y 62 V, respectivamente); MTX-PG5 (ión molecular – fragmentos, m/z) 970 – 175.05 y 970 – 133.95 (energía de colisión de 78 y 80 V, respectivamente).

### **6.9 Validación del método analítico.**

El método analítico empleado para la cuantificación de los MTX-PGn fue previamente validado, a través de la evaluación de selectividad, efecto de matriz, efecto de acarreo, límite inferior de cuantificación, límite de detección, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y estabilidad de la muestra. Debido a la incorporación de otro analista en el desarrollo del método fue necesario realizar una validación parcial mediante la evaluación de límite inferior de cuantificación, límite de detección, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y exactitud, de acuerdo con lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013.

Las muestras de eritrocitos aislados de cada paciente se analizaron interpolando la respuesta del equipo en una curva de calibración de estándares de MTX-PG3 y MTX-PG5 elaboradas cada día del análisis. En cada corrida analítica se incluyó el análisis de los controles de calidad QCB, QCM, QCA.

### **6.10 Análisis Estadístico.**

Se realizó una prueba de Kolmogórov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos; las características clínicas y antropométricas basales. Las variables continuas con distribución normal, se presentan como media y desviación estándar; datos no paramétricos se muestran como mediana y rango intercuartílico. Las características basales de los grupos de estudio se compararon mediante la prueba de T-Student para datos paramétricos o la prueba U-Mann Whitney para datos no paramétricos.

Las diferencias de las características clínicas y las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 con respecto al tiempo y al esquema de tratamiento con MTX se evaluó mediante una prueba de ANOVA-2 vías. Finalmente, se evaluó la relación entre la frecuencia de eventos adversos con el tipo de temporalidad; así como, la relación entre la disminución del  $\Delta$ DAS28 con la temporalidad del tratamiento mediante una prueba de  $\chi^2$ .

Se estableció un valor de significancia estadística de  $p \leq 0.05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPad versión 5.01.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 7.1 Características de los pacientes con AR.

En la tabla 7.1 se muestran las características antropométricas y clínicas de los grupos de pacientes en tratamiento con MTX cotidiano y MTX semanal.

**Tabla 7.1** Características antropométricas y clínicas de los pacientes bajo temporalidad cotidiana y semanal al inicio del estudio.

Variables	Total (n=92)	MTX Cotidiano (n=45)	MTX Semanal (n=47)	<i>p</i>
Edad (años)	46 (37-52)	46 (36-52)	46 (41-52)	0.59
Peso (Kg)	68.9 ± 13.8	68.0 ± 13.9	69.0 ± 13.5	0.95
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28.4 ± 5.5	28.9 ± 5.8	28.0 ± 5.2	0.40
Articulaciones inflamadas (n)	10 (8-14)	10 (7-12)	10 (8-14)	0.68
Articulaciones dolorosas (n)	9 (4-15)	8 (4-14)	10 (5-16)	0.28
EVA	60 (50-80)	60 (40-75)	60 (50-80)	0.08
VSG (mm/h)	25.45 ± 12.60	24 ± 13.12	28 ± 11.72	0.40
Eritrocitos (células/μL)	4.6 ± 0.42	4.6 ± 0.46	4.7 ± 0.32	0.28
Leucocitos (células/μL)	6.6 (5.54-8.4)	6.5 (6-7.3)	7.0 (5.4-8.7)	0.55
DAS28	5.4 ± 1.2	5.3 ± 1.2	5.6 ± 1.2	0.36

\*Los resultados se muestran como mediana (rango intercuartílico) o media ± desviación estándar.

Se incluyeron a 92 pacientes con AR de recién diagnóstico, de los cuales 96.74% fueron mujeres con una edad promedio de 45 años. La alta proporción de pacientes de sexo femenino con diagnóstico de AR está documentada epidemiológicamente <sup>(2, 12, 38, 39)</sup>. Si bien, no se conoce la causa de la alta prevalencia de AR en mujeres, se sugiere una posible influencia de factores hormonales tales como el estrógeno y la prolactina debido a la estimulación que provocan en la producción de autoanticuerpos de células B <sup>(2, 38)</sup>. Lima y cols. en 2014<sup>(40)</sup>, señalaron que el comienzo de la menopausia puede ser un factor de riesgo para adquirir AR, debido a los cambios hormonales que sufren las mujeres; lo anterior coincide con la edad promedio inicial de la enfermedad que es de 50 ± 10 años.

De acuerdo con el índice de masa corporal (IMC) obtenido, se presentó una proporción de pacientes con obesidad de 40%. El estudio de Symmons y cols., (1997) destacó que los pacientes con IMC ≥30 Kg/m<sup>2</sup> presentaron mayor probabilidad de padecer AR (OR 3.74,

95% IC 1.14-12.27)<sup>(41)</sup>. Una posible explicación entre la obesidad y este padecimiento se debe a los mecanismos de inflamación presentes en el tejido adiposo, sobre todo con la inflamación sistémica crónica. González y cols., (2016) describieron a la obesidad como un estado proinflamatorio, generado por adipocinas provenientes del tejido adiposo blanco, las cuales promueven la elevación de marcadores inflamatorios tales como el factor de necrosis tumoral, IL-1, IL-6, IL-17, entre otros<sup>(42)</sup>. A su vez, las adipocinas favorecen el desarrollo de enfermedades inflamatorias autoinmunes mediante alteraciones metabólicas que incluyen complicaciones cardiovasculares<sup>(43)</sup>.

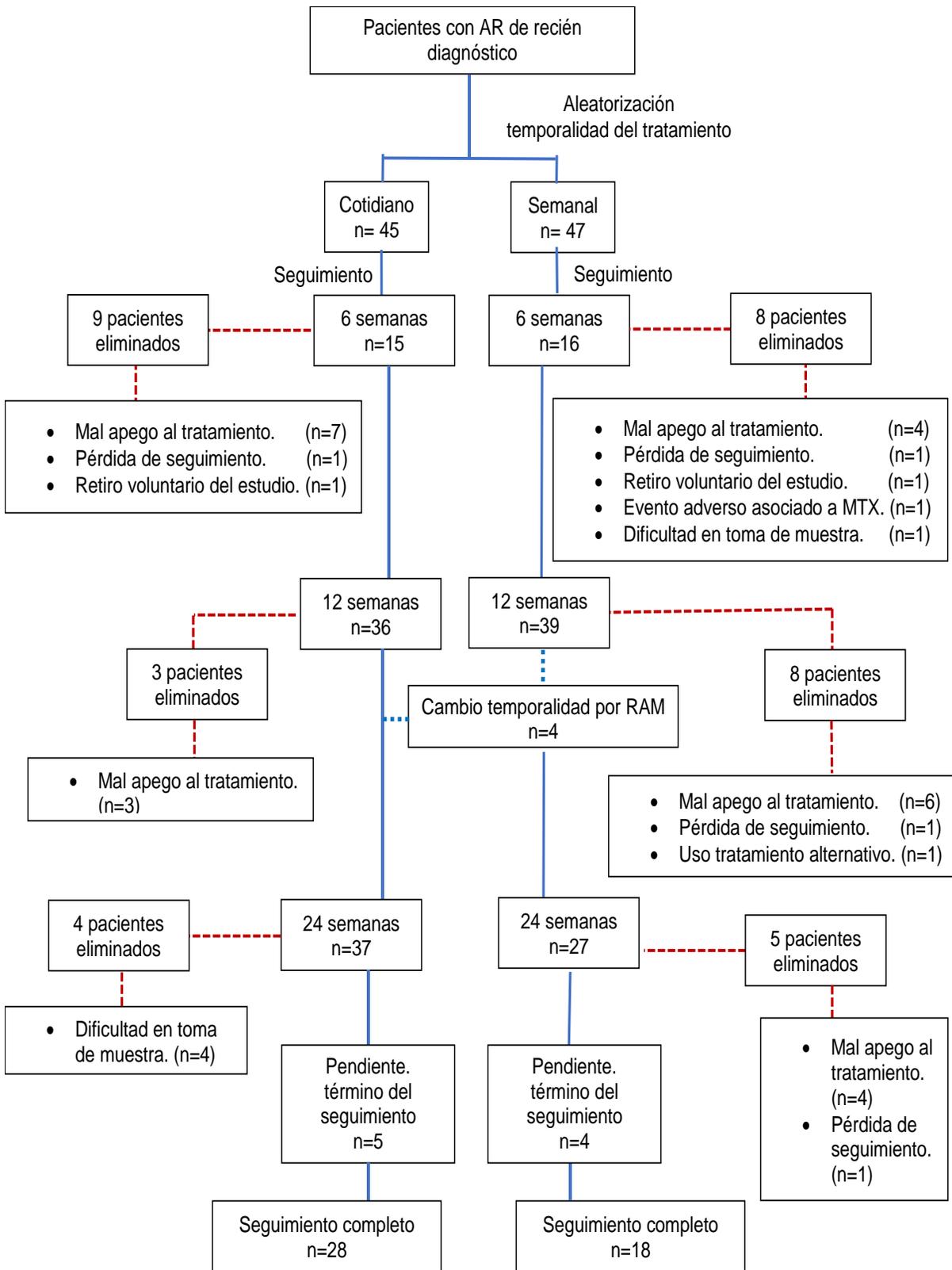
La enfermedad concomitante con mayor predominio fue la hipertensión arterial (10.87%); precisamente, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares es una de las principales comorbilidades que favorece el aumento de la mortalidad en pacientes con AR<sup>(2, 7)</sup>.

Con relación al grado de enfermedad registrado al inicio del estudio, los pacientes de ambos grupos mostraron AR catalogada en un nivel que corresponde a actividad severa por el valor de DAS28, y de dolor fuerte por los resultados de EVA. Clínicamente, se considera que un estado de AR de alta actividad presenta en promedio 18 articulaciones inflamadas, EVA de 50 y VSG de 45<sup>(44)</sup>.

Ninguna de las variables mostradas en la Tabla 7.1 presentó diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, por lo que se asumió que las características basales, clínicas y antropométricas fueron similares, lo cual constituye una evidencia de que el proceso de aleatorización que se realizó para el diseño experimental del presente estudio fue adecuado.

## **7.2 Seguimiento de pacientes con AR bajo tratamiento con MTX.**

De los 92 pacientes incluidos, sólo el 50% completaron el estudio hasta las 24 semanas; de éstos, 62% (28 participantes) pertenecían al grupo en temporalidad cotidiana y 38% (18 participantes) al grupo en temporalidad semanal con MTX. Durante el seguimiento, 36% de los pacientes del grupo en temporalidad cotidiana y 45% del grupo en temporalidad semanal, se retiraron del protocolo; mientras que un total de 9 pacientes, 5 (10%) y 4 (11%) del grupo en temporalidad cotidiana y semanal, respectivamente, no habían terminado el tratamiento con MTX al momento de realizar el análisis estadístico (Figura 7.1).



**Figura 7.1** Seguimiento de los pacientes con AR durante el estudio.

De acuerdo con los resultados encontrados, se registró una importante proporción de pacientes que no concluyeron el estudio, principalmente debido al desapego al tratamiento, sobre todo, en los pacientes que recibieron el medicamento en el esquema de dosificación semanal. Como se mencionó anteriormente, la administración semanal presenta el inconveniente de presentar menos adherencia, ya que los pacientes presentan confusión y adaptación a esta pauta de dosificación, lo que ocasiona el olvido o en ocasiones provoca la sobredosificación del fármaco. Entre las principales causas de desapego al tratamiento según Bello y cols., (2017) se encuentran: olvido de tomar el fármaco (33%), considerar que no es necesario ingerir el fármaco ya que el paciente siente estar bien (24%) y preocupación por la seguridad del fármaco a largo plazo (24%)<sup>(10)</sup>. Como se ha mencionado anteriormente, diversos estudios previos han reportado la incidencia de errores de medicación asociados a la administración semanal de MTX <sup>(16, 18, 32, 34)</sup>. Valverde y cols., (2001) describieron el caso de un paciente de 79 años que recibió MTX en prescripción de 15 mg/día, en lugar de 15 mg/semana; después de recibir nueve dosis seguidas del fármaco, el paciente falleció<sup>(32)</sup>. Un caso contrario se registró en el presente estudio: una paciente de 26 años recibió una prescripción de 12.5 mg de MTX bajo el esquema de dosificación semanal, sin embargo, la paciente interpretó que la dosificación consistía en tomar solamente un comprimido del fármaco un día a la semana.

En comparación con lo anterior, los pacientes bajo el esquema de dosificación cotidiano presentaron menos casos de abandono del tratamiento.

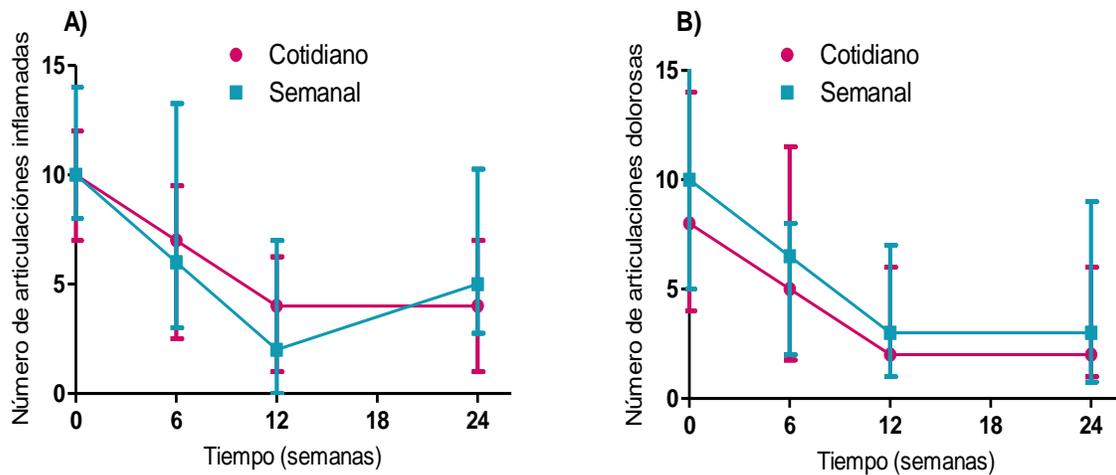
Otras causas de pérdida de los pacientes en este estudio fueron debidas al cambio de localidad de residencia, retiro voluntario, evento adverso asociado al MTX, dificultad en la toma de muestra y el uso de tratamientos alternativos para la AR.

### **7.3 Evaluación de la temporalidad del tratamiento con la eficacia clínica del MTX.**

Durante el estudio, se determinaron las principales características clínicas de la remisión de la enfermedad de acuerdo con los criterios ACR50, los cuales son útiles para comparar la actividad de la enfermedad en tiempo basal y posterior a la administración del medicamento.

Para ello, se evaluó el efecto de la temporalidad del tratamiento cotidiano (n=28) y semanal (n=18) mediante el conteo de las articulaciones inflamadas, dolorosas, EVA y DAS28 a través de un análisis de varianza de 2 factores.

**7.3.1 Articulaciones inflamadas y dolorosas.** En la Figura 7.2 se observa que la evolución clínica es favorable hacia las 12 y 24 semanas bajo ambos esquemas de tratamiento con MTX, lo anterior se aprecia a través de la disminución del número de articulaciones inflamadas y dolorosas; no obstante, destaca una amplia variabilidad en dicha respuesta.



**Figura 7.2** Evaluación de la temporalidad del tratamiento con la eficacia clínica del MTX [(A) Número de articulaciones inflamadas, (B) número de articulaciones dolorosas]. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico.

Específicamente, mediante el régimen cotidiano, se observó una disminución de articulaciones inflamadas con una mediana (rango intercuartílico) de 10 (7-12) a 4 (1-7); mientras que la temporalidad semanal presentó una mayor disminución desde 10 (8-14) hasta 2 (0-7) articulaciones inflamadas durante las primeras 12 semanas de tratamiento con MTX. Por otro lado, el régimen cotidiano se mantuvo sin cambios de la semana 12 a la 24; mientras que, en el régimen semanal, se observa un incremento en el número de articulaciones inflamadas, con una mediana de 5 (3-10) a las 24 semanas. El número de articulaciones inflamadas disminuyó significativamente después de 6, 12 y 24 semanas del inicio del tratamiento con MTX ( $p < 0.05$ ); sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la temporalidad semanal y la cotidiana ( $p = 0.95$ ). En el estudio de Kremer y cols., (1995), con la administración semanal de MTX se observó una disminución sostenida del número de articulaciones a partir de las 12 semanas <sup>(30)</sup>. Autores como Pandya y cols., (2002) identificaron la remisión de la enfermedad con dosis semanal a partir de las 4 semanas de tratamiento con un conteo de las articulaciones

inflamadas de  $6.5 \pm 6.6$  a  $4.10 \pm 6.14$ , sin embargo, la respuesta no fue sostenida y presentó notables incrementos en periodos posteriores <sup>(29)</sup>.

Al evaluar el número de articulaciones dolorosas, se encontró una disminución sostenida cuya mediana (rango intercuartílico) fue de 8 (4-14) a 2 (2-6) a las 12 semanas para la temporalidad cotidiana y de 10 (5-16) a 6 (2-8) para la temporalidad semanal, lo cual se mantuvo sin cambios en ambos esquemas de tratamiento con MTX después de 24 semanas. El número de articulaciones dolorosas disminuyó significativamente después 12 semanas del inicio del tratamiento con MTX ( $p < 0.05$ ). Kremer y cols., (1995) registraron una importante disminución del número de articulaciones dolorosas de un valor inicial de (media  $\pm$  desviación estándar)  $7.6 \pm 7.2$  a  $-1.6 \pm 3.5$  y  $-2.7 \pm 4.3$  a las 6 y 18 semanas, respectivamente, la cual se mantuvo hasta las 24 semanas en tratamiento semanal con el fármaco<sup>(30)</sup>.

Otros autores han descrito que hasta un 20% de los pacientes en remisión, pueden tener dos o más articulaciones dolorosas y que el número de articulaciones inflamadas puede llegar a ser superior a 5 <sup>(17)</sup>. Lo anterior pone de manifiesto la amplitud de la variabilidad a la cual está sujeta la respuesta clínica.

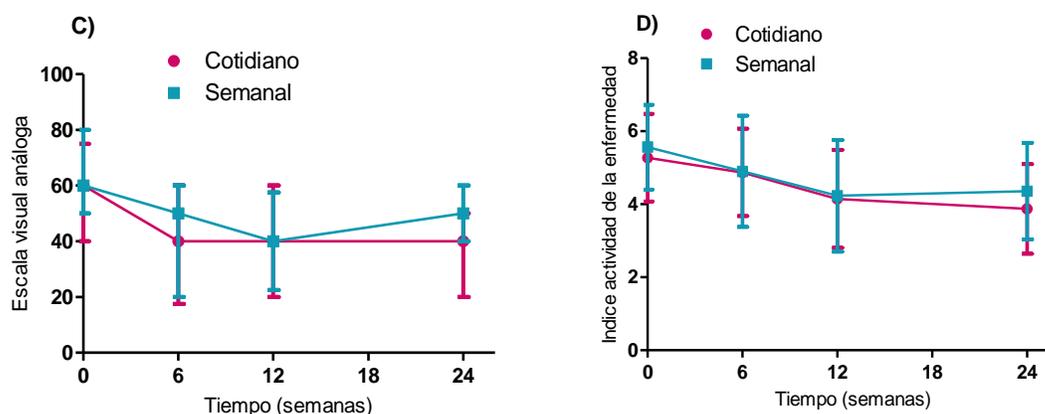
Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un efecto sostenido en la disminución significativa del número de articulaciones inflamadas y dolorosas en pacientes con recién diagnóstico de AR bajo tratamiento con MTX. Al evaluar el efecto de la temporalidad del tratamiento semanal o cotidiano sobre el número de articulaciones, no se encontraron diferencias significativas entre éstos ( $p=0.950$ ;  $p=0.731$ ), por lo que se considera que la eficacia clínica no se compromete al administrar el MTX en régimen cotidiano o semanal.

**7.3.2 Escala visual análoga.** Mediante el valor de EVA fue posible demostrar para ambas temporalidades que la percepción de dolor evolucionó desde un nivel fuerte al comienzo de las dosis, hasta un nivel moderado (medianas de 60 y 40, respectivamente) a las 12 semanas del tratamiento. Este nivel de control de dolor se mantuvo en la semana 24 para la administración diaria del MTX, mientras que bajo la dosificación semanal se observó nuevamente un aumento hacia un nivel de dolor fuerte, aunque con notable variabilidad entre pacientes (mediana, rango; 50, 40-60) (Figura 7.3). Pandya y cols., (2002) encontraron resultados contrarios, pues la intensidad del dolor fue mayor en un grupo con dosificación dos veces a la semana (media; desviación estándar;  $47.18 \pm 18.6$  vs  $36.79 \pm$

21.5) que en un grupo con esquema semanal en la semana 16 posterior al inicio del tratamiento<sup>(29)</sup>.

A pesar de que se observó una disminución en la evolución del dolor, no se encontró una asociación entre el valor de EVA respecto a la temporalidad del tratamiento ( $p=0.244$ ).

Si bien la presencia de articulaciones inflamadas, el dolor articular y la elevación de los reactantes de fase aguda son los signos más directos del desarrollo de un proceso inflamatorio<sup>(9)</sup>, la falta de precisión clínica de estos parámetros y la naturaleza de las lesiones producidas hacen de la valoración de la actividad inflamatoria un proceso complejo<sup>(17)</sup>.



**Figura 7.3** Evaluación de la temporalidad del tratamiento con la eficacia clínica del MTX [(C) EVA, (D) DAS28]. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico.

**7.3.3 Índice de actividad de la enfermedad.** El parámetro clínico de rutina que se utiliza actualmente para la evaluación integral de la actividad de la enfermedad es el DAS28. La evaluación basal de dicho índice en ambos grupos de pacientes con AR incluidos en el presente estudio, correspondió a una actividad severa al comienzo de la enfermedad, de acuerdo con los criterios de la ACR, sin diferencias entre grupos (Tabla 7.1).

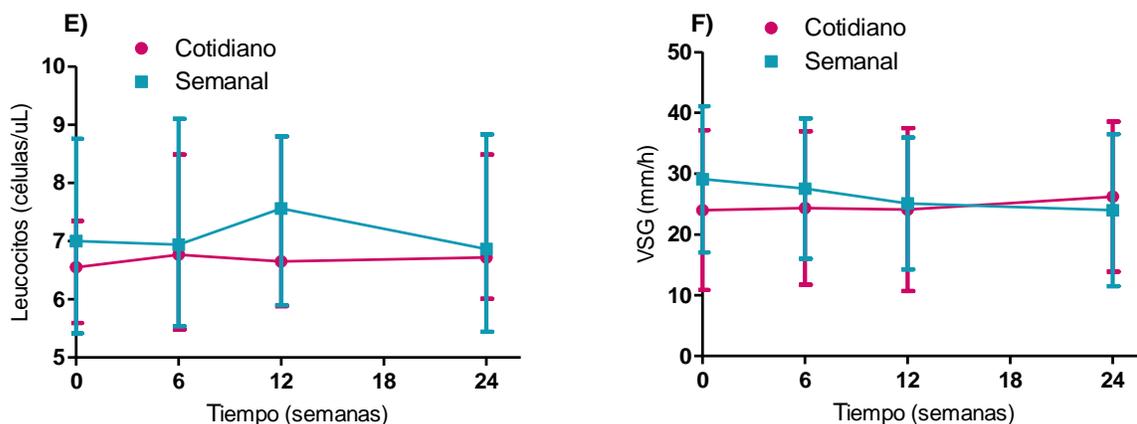
A partir de la semana 6 en la temporalidad cotidiana y semanal se presentó una disminución media del DAS28 ( $\Delta$ DAS28) de -0.4 y -0.7; mientras que, a las 12 semanas, el  $\Delta$ DAS28 fue -1.1 y -1.3, respectivamente. Finalmente, a la semana 24 el  $\Delta$ DAS28 registró resultados de -1.4 en la temporalidad cotidiana y -1.2 en la temporalidad semanal (Figura 7.3).

En general, una puntuación de -1.2 en  $\Delta$ DAS28 para un paciente con AR, se considera un cambio significativo traducido clínicamente como buena respuesta al tratamiento; los pacientes con mala respuesta obtienen un valor de  $\Delta$ DAS28 de -0.6; mientras que cifras de este parámetro entre -0.6 y -1.2 clasifica a los pacientes con una respuesta moderada al MTX <sup>(45)</sup>.

En este estudio se observó que a las 6 semanas no se presentaron cambios significativos en la respuesta al tratamiento ( $\Delta$ DAS28 de -0.6) mientras que en la semana 12 y 24 la evolución clínica fue significativa ( $\Delta$ DAS28 mayor de -1.2). De acuerdo a Takahashi, Kaneko y cols., (2017), a partir de la semana 12 el 60% de los pacientes logran una remisión clínica de la enfermedad y esa respuesta puede mantenerse en la mayoría de los pacientes<sup>(27)</sup>.

Al evaluar el efecto del esquema de dosis en la mejora clínica respecto a la disminución del DAS28 a las 12 y 24 semanas de tratamiento, se encontró que no existe un efecto significativo entre la temporalidad con que se administra el fármaco y el DAS28 ( $p=0.779$ ).

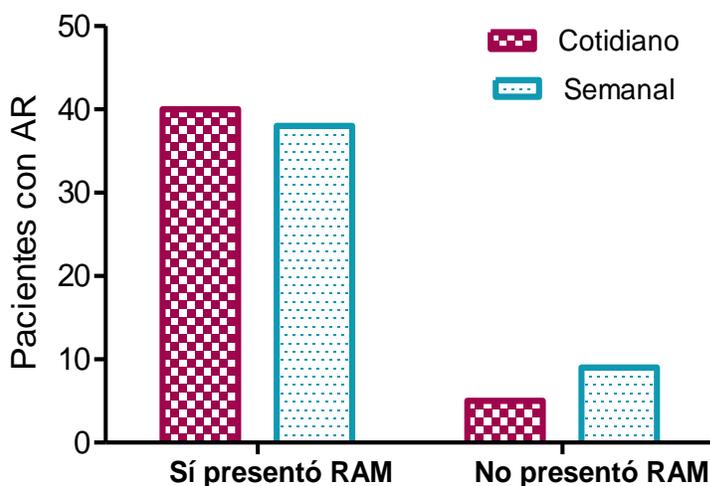
**7.3.4 Velocidad de sedimentación globular y niveles leucocitarios.** De acuerdo con la Figura 7.4 se observó similitud en los valores de VSG y los niveles leucocitarios entre ambos grupos a lo largo del estudio ( $p=0.823$ ;  $p=0.784$ ); si bien diversos autores han descrito a ambos parámetros clínicos como una herramienta diagnóstica para la determinación de enfermedades inflamatorias e infecciosas <sup>(46, 47)</sup>, existen diversos factores que pueden ocasionar su incremento tales como: la edad, sexo, método de determinación, enfermedad cardíaca, lupus, otros procesos inflamatorios, etc.<sup>(48)</sup>. Dado que la VSG y los niveles leucocitarios son marcadores inespecíficos de inflamación en la AR<sup>(46)</sup>, se deben determinar en conjunto con otras proteínas de fase aguda tales como la PCR, así como algunos componentes del complemento sérico (específicamente C3), el amiloide A sérico y la haptoglobina, entre otros, para realizar un seguimiento indirecto del grado de inflamación de un paciente con AR<sup>(46)</sup>.



**Figura 7.4** Evaluación de la temporalidad del tratamiento y marcadores indirectos de inflamación en AR [(E) Leucocitos (células/  $\mu$ L) y (F) VSG (mm/h)]. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico.

#### 7.4 Asociación de eventos adversos con la temporalidad del tratamiento.

Durante un periodo de 24 semanas, se registraron 14 pacientes (15.22%) que refirieron presentar eventos adversos asociados al MTX; 5 pacientes (11%) pertenecían al grupo de temporalidad cotidiana mientras que 9 pacientes (19%) recibieron el fármaco de manera semanal (Figura 7.5). Hernández y cols., (2013) señalan que la toxicidad del MTX es dependiente de la dosis<sup>(49)</sup>. Esta podría ser una de las causas por la cual, la temporalidad semanal presentó mayor número de eventos adversos.



**Figura 7.5** Eventos adversos con MTX registrados por temporalidad en todos los pacientes con AR incluidos durante el desarrollo del estudio.

La mayoría de los eventos adversos reportados en este estudio consistieron en trastornos gastrointestinales (Tabla 7.2), de los cuales, náuseas y gastritis fueron los más frecuentes en el grupo con dosificación semanal con respecto al grupo con dosificación diaria. Efectivamente, diversos estudios tienen registrado que los trastornos gastrointestinales son los más comunes en los primeros 6 meses de tratamiento con afectación hasta en el 66% de los pacientes con AR <sup>(15, 50, 51)</sup>.

**Tabla 7.2** Principales eventos adversos asociados a MTX n=14

Eventos adversos	MTX cotidiano	MTX semanal
Náuseas	0	4
Diarrea	0	1
Gastritis	1	4
Dolor abdominal	0	1
Irritación ocular	1	0
Dolor de cabeza	0	1
Incremento ALT/AST	3	1
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>12</b>

Los niveles de transaminasas hepáticas (ALT y AST > 40 U/L) a lo largo del estudio se incrementaron en 4 pacientes. Adicionalmente, a las 6 semanas se reinició el tratamiento en otros 2 pacientes de temporalidad cotidiano, uno de ellos debido al incremento de estas enzimas y otro paciente por irritación gástrica. Por otro lado, a las 12 semanas fue necesario cambiar a 4 pacientes del grupo de temporalidad semanal al esquema cotidiano debido a la intolerancia gástrica que presentaron.

En 3 pacientes, fue necesaria la reducción de la dosis de MTX y que 2 de ellos que recibieron el régimen cotidiano presentaron aumento de los niveles de transaminasas hepáticas y 1 paciente correspondiente a la administración semanal fue debido al incremento de los niveles de creatinina sérica (>1.3 mg/dL). Adicionalmente, un paciente de la temporalidad semanal tuvo que ser eliminado del estudio a las 6 semanas por causa de intolerancia al fármaco.

La toxicidad hepática asociada al MTX ya sido evaluada desde hace varias décadas desde que se determinó el tratamiento de psoriasis. <sup>(52)</sup> Al respecto, Pandya y cols., (2002), reportaron casos con transaminasas hepáticas en niveles de 80 U/L y asociaron la frecuencia de la administración del fármaco con la alta incidencia de toxicidad hepática <sup>(29)</sup>. De manera específica, es recomendable suspender el tratamiento con MTX si el valor de

ALT y/o AST sobrepasa más de tres veces el límite superior de normalidad (>40 U/L); así mismo, se considera que es posible reiniciar con dosis más baja una vez normalizados los niveles de las transaminasas <sup>(49)</sup>.

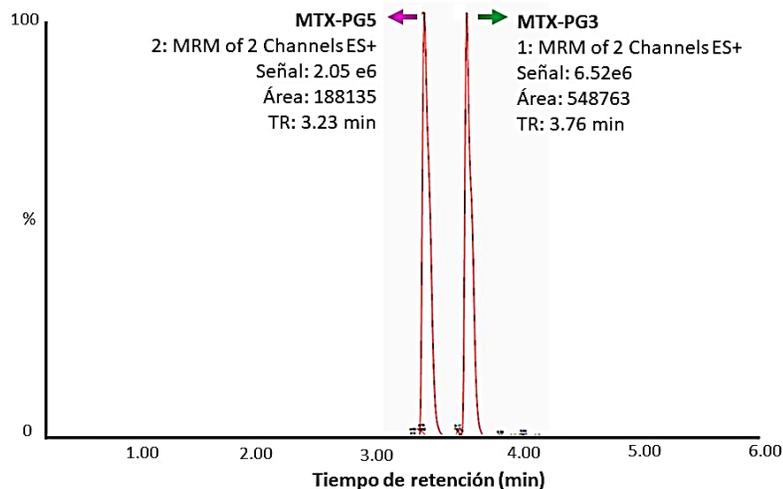
Una propuesta de Kremer y cols., (1995), consistió en administrar el MTX en dosis bajas con mayor frecuencia, con el propósito de conseguir la disminución de efectos tóxicos, sin embargo, en nuestro estudio se observó un caso contrario, ya que en 3 pacientes del grupo en temporalidad cotidiana en promedio se incrementaron las enzimas ALT y AST a niveles de 325 U/L<sup>(30)</sup>. Una posible explicación de la elevación de dichas enzimas se debe a que la toxicidad hepática está relacionada con la acumulación intracelular de MTX-PGn y con la disminución de folato en el tejido hepático. Si bien, no se ha establecido una clara relación con la disminución de folatos, Van Ede y cols., (2001), señalaron que el suplemento de folatos reduce la incidencia de elevación de transaminasas hepáticas<sup>(53)</sup>.

Por otra parte, debido a que la eliminación renal es la ruta que contribuye en mayor proporción al aclaramiento del MTX, este fármaco debe ser empleado con precaución en pacientes con insuficiencia renal. Ante esta situación, al paciente que presentó notable aumento de los niveles de creatinina sérica fue necesario reducir la dosis, tal como lo indican las guías de manejo clínico <sup>(42)</sup>.

Al comparar la incidencia de eventos adversos en este estudio, no se encontraron diferencias significativas de acuerdo con la temporalidad del tratamiento con MTX (Figura 10.5,  $p= 0.387$ ).

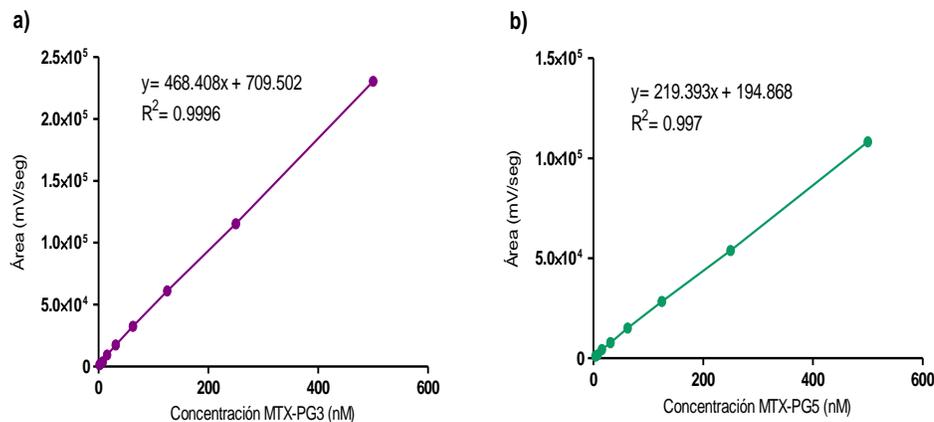
## **7.5 Cuantificación de las concentraciones de MTX-PG3 y MTX-PG5 por UPLC-MS/MS.**

**7.5.1 Validación parcial del método analítico.** La cuantificación intraeritrocitaria de los MTX-PG3 y MTX-PG5 fue posible mediante el método analítico previamente implementado. De acuerdo con lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013, el método fue selectivo y específico para la detección de ambos MTX-PGn (Figura 7.6.).



**Figura 7.6** Cromatograma de MTX-PG5 (izquierda) y MTX-PG3 (derecha).

Las curvas de calibración demostraron una relación lineal para el MTX-PG3 ( $R^2 > 0.99$ ) en un intervalo de 1.9 a 500 nM y para el MTX-PG5 ( $R^2 > 0.99$ ) en un intervalo de 3.9 a 500 nM (Figura 7.7).



**Figura 7.7** Curva de calibración de MTX-PG3 (a) y MTX-PG5 (b) en eritrocitos.

Los resultados de concentración recuperada (Tabla 7.3), cumplieron con los criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013, ya que al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración se encontraron dentro del 15% de la concentración nominal.

**Tabla 7.3** Concentraciones recuperadas en la curva de calibración para la cuantificación de MTX-PGn en eritrocitos

Concentración nominal (nM)	MTX-PG3		MTX-PG5	
	Concentración promedio recuperada (nM)	%Recobro	Concentración promedio recuperada (nM)	%Recobro
1.9	1.6	86.6		
3.9	3.7	94.9	3.8	97.1
7.8	6.4	81.9	6.4	81.3
15.6	18.5	118.4	18.6	114.5
31.25	35.5	107.4	34.5	110.3
62.5	68.0	108.9	67.8	108.5
125	128.9	103.1	128.3	102.6
250	244.8	97.9	244.7	97.9
500	490.3	98.1	492.1	98.4

El límite de detección (LDD) se calculó con el promedio de las concentraciones de 3 blancos más 3DE (siendo DE la desviación estándar del promedio de estas mediciones); y el límite de cuantificación (LDC) se estableció con 10DE (Tabla 7.4).

**Tabla 7.4** Límite de detección y cuantificación MTX-PG3 y MTX-PG5

Analito	LDD (nM)	LDC (nM)
MTX-PG3	0.23	0.52
MTX-PG5	0.27	2.19

La precisión y exactitud del método se calcularon mediante estándares (QC) con concentraciones QCB, QCM y QCA. El análisis se realizó por quintuplicado en un mismo día (repetibilidad) y en tres corridas analíticas diferentes (reproducibilidad). Se obtuvo un coeficiente de variación promedio menor al  $\leq 15\%$  y valor promedio del % de recuperación  $\leq 15\%$ . Los resultados se muestran en la Tabla 7.5.

**Tabla 7.5** Precisión y exactitud del método analítico.

<b>Analito</b>	<b>Nivel QC</b>	<b>Concentración nominal (nM)</b>	<b>Concentración promedio recuperada (nM)</b>	<b>%CV</b>	<b>Exactitud (% de error)</b>
<b>Repetibilidad</b>					
MTX-PG3	LIC	1.9	1.7	4.37	10.78
	QCB	10	8.5	5.15	14.60
	QCM	50	47.3	12.53	5.40
	QCA	400	377.5	2.84	5.63
	MCD	600 (1:2)	568.7	5.20	3.18
MTX-PG5	LIC	3.9	3.8	4.79	3.40
	QCB	10	9.2	4.79	3.40
	QCM	50	50.5	12.51	1.04
	QCA	400	391.86	2.59	2.03
	MCD	600 (1:2)	599.8	0.02	3.32
<b>Reproducibilidad</b>					
MTX-PG3	LIC	1.9	1.87	10.87	1.52
	QCB	10	8.50	8.36	12.60
	QCM	50	13.24	13.24	7.76
	QCA	400	2.63	2.63	4.34
MTX-PG5	LIC	3.9	3.94	9.08	1.02
	QCB	10	8.96	8.84	10.4
	QCM	50	44.24	7.17	11.52
	QCA	400	345.6	14.36	13.6

Adicionalmente, se evaluó la estabilidad de las muestras mediante estándares QC con concentraciones QCB, QCM y QCA por triplicado, así como la estabilidad a corto y largo plazo, y la estabilidad en los ciclos de congelación-descongelación. De acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras presentaron estabilidad durante al menos 30 días a temperatura de -80°C (desviación estándar  $\leq 15\%$ ) y resisten dos ciclos de congelación-descongelación (desviación estándar  $\leq 15\%$ ).

Con los resultados anteriores, quedó demostrada la validez estadística del método analítico de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 <sup>(54)</sup> para su aplicación en el análisis de muestras sanguíneas de pacientes que reciben tratamiento con MTX para la AR.

## 7.6 Cuantificación intraeritrocitaria de MTX-PG3 y MTX-PG5 en muestras de pacientes con AR bajo tratamiento con MTX.

Se obtuvo un total de 131 concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PGn durante la realización del estudio, procedentes de cada una de 25 pacientes en la semana 6, de 58 pacientes en la semana 12 y de 48 pacientes en la semana 24.

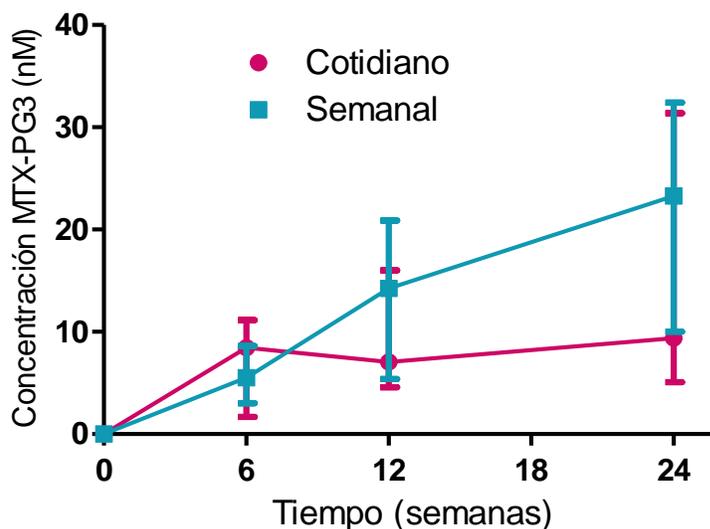
Sólo fue posible la determinación de los niveles de MTX-PG3 ya que, en la totalidad de las muestras provenientes de los pacientes, las concentraciones de MTX-PG5 se encontraron por debajo del LDD (0.27 nM) para los dos regímenes de tratamiento, situación que se discutirá más adelante.

En la Tabla 7.6 y en la Figura 7.8 se muestran la mediana (rango intercuartílico) de las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 para la temporalidad cotidiana y semanal.

**Tabla 7.6** Concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 (nM) en pacientes con AR

Tiempo (semanas)	MTX cotidiano	MTX semanal
6	8.45 (1.7-11.15)	5.50 (3.0-8.6)
12	7.0 (4.6-16)	14.25(5.38-20.88)
24	9.4 (5.10-31.40)	23.30 (10-32.40)

\*Los resultados se muestran como mediana (rango intercuartílico)



**Figura 7.8** Concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 (nM) vs tiempo (semanas), de acuerdo con la temporalidad del tratamiento con MTX en pacientes con AR. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico.

A medida que transcurrió el tratamiento, se registró una gran variabilidad en las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 en ambos grupos. Después de 24 semanas en tratamiento con MTX, el coeficiente de variación obtenido para las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 fue de 81% para el grupo en temporalidad cotidiana y 65% para el grupo en temporalidad semanal. Se observó que, con la dosis diaria, los niveles de este metabolito tendieron a estabilizarse alrededor de 10 nM desde la semana 6 hasta la 24, contrario a lo que sucedió con el régimen semanal, las cuales continuaron en aumento desde que inició el tratamiento hasta el último muestreo de las 24 semanas, obteniendo una concentración media de MTX-PG3 dos veces mayor en comparación con el grupo de administración cotidiana. Si bien, no existe información previa en la que se comparen las concentraciones intraeritrocitarias de estos esquemas de dosificación, una posible causa del incremento es que la dosis única con una cantidad acumulada de MTX implica la formación de mayores concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PGn <sup>(25)</sup>. En tres estudios prospectivos se observó una relación del aumento de la dosis del fármaco y la acumulación de MTX-PGn en eritrocitos <sup>(27, 36, 55)</sup>. Otra explicación a la elevación de niveles de MTG-PG3 en glóbulos rojos corresponde al tiempo de muestreo, pues, aunque para ambos grupos la dosis de fármaco total era la misma y las muestras fueron tomadas 24 h post-dosis, los pacientes en temporalidad semanal habían recibido una mayor dosis total antes de la toma de la muestra.

En el trabajo de Murosaki y cols., (2016), los niveles de MTX-PG2 a MTX-PG4 se encontraron significativamente correlacionados con la actividad de la enfermedad, por lo que los autores propusieron que los mencionados MTX-PG podrían ser considerados como indicadores de la eficacia del MTX<sup>(26)</sup>. Específicamente, Den Boer y cols., (2016) determinaron que el MTX-PG3 es la forma intraeritrocitaria predominante de los MTX-PGn y que en concentraciones intraeritrocitarias promedio de 39.9 (24.8-53.6) nM produce adecuada respuesta al tratamiento de la AR<sup>(12)</sup>.

A través de una regresión multivariada, otros autores han identificado que la edad, los polimorfismos genéticos de FPGs y el folato eritrocitario están involucrados en 14%, 4%, 21% de la variabilidad de las concentraciones del MTX-PG1, 2 y 3, respectivamente, a las 12 semanas posteriores al inicio del tratamiento <sup>(12)</sup>.

Las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 encontradas en el presente estudio, son similares a las reportadas previamente. Dalrymple y cols., (2008) en el muestreo sanguíneo realizado a las 36 horas antes de la siguiente administración de MTX (12.5 mg)

después de 24 semanas en tratamiento reportaron concentraciones de MTX-PG3 en el intervalo de 33.63 a 130.05 nM<sup>(22)</sup>. Murosaki y cols., (2016), quienes tomaron muestras de sangre 24 horas antes de la siguiente dosis semanal de MTX (15 mg), reportaron niveles entre 0 a 88.9 nM de MTX-PG3 después de 24 semanas en tratamiento<sup>(26)</sup>. Si bien no existen estudios previos que evalúen las concentraciones de MTX-PG3 a partir de la administración de dosis bajas de MTX para el tratamiento de la AR en población mexicana, uno de los posibles factores que pueden ocasionar el incremento de este metabolito en la administración dosis semanal se atribuye al tiempo de muestreo post-dosis realizado en nuestra población.

Varios estudios han reportado concentraciones nulas de algunos poliglutamatos. Tal es el caso de Murosaki y cols., (2016), quien a lo largo de 24 semanas reportó desde valores debajo del LDD hasta 88.9 nM para MTX-PG3 (mediana de 24.7 nM) y hasta 11.9 nM para MTX-PG5 (mediana <LDD) <sup>(26)</sup>. Anteriormente, se comentó que los niveles eritrocitarios de MTX-PG5 en este trabajo fueron indetectables en todos los pacientes que recibieron dosis cotidiana o dosis semanal. Esta misma tendencia de resultados ya ha sido previamente comentada por otros autores para el caso particular de MTX-PG5, para lo cual hay reportes menores a 4 nM, e inclusive por debajo del LDC <sup>(12, 21, 55)</sup>. Una de las posibles causas se atribuye al metabolismo de los MTX-PGn; debido a que la enzima gamma-glutamil hidrolasa remueve los residuos de glutamato, se reduce la velocidad de acumulación del metabolito. En el caso de MTX-PG5, tendrían que transcurrir aproximadamente 140 semanas de tratamiento para lograr el equilibrio dinámico en niveles máximos de 10 nM <sup>(12, 21, 22)</sup>; ya que mientras más prolongada sea la duración del tratamiento, mayores concentraciones de MTX-PG5 podrán ser cuantificadas <sup>(56)</sup>.

### **7.7 Efecto de la temporalidad del tratamiento sobre las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3.**

Como ya se ha señalado, se encontró una amplia variabilidad en las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 en ambas temporalidades.

Mediante una prueba estadística ANOVA de 2 vías, se evaluó el efecto de la temporalidad del tratamiento cotidiano (n=28) y semanal (n=18) sobre los niveles intraeritrocitarios de MTX-PG3 a las 12 y 24 semanas. A pesar de que se observa una tendencia en la temporalidad semanal en presentar mayores concentraciones de MTX-PG3 con respecto a la temporalidad cotidiana, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p=0.941$ ). Por otro lado, el tiempo en tratamiento es un factor que

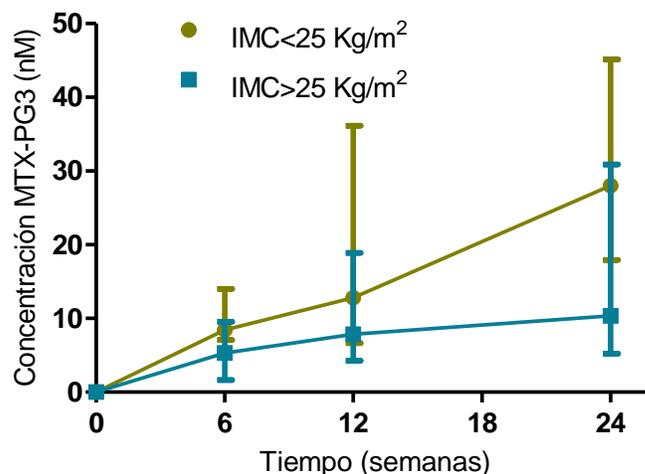
contribuye a la acumulación significativa del MTX-PG3 ( $p=0.0192$ ) independientemente de la temporalidad. Lo anterior, ha sido reportado por otros autores quienes señalaron que el tiempo para alcanzar el equilibrio dinámico en las concentraciones intraeritrocitarias de este metabolito es de 8 semanas a dosis 2.5 mg MTX por semana y aumenta hasta 20 semanas en dosis de 20 mg/semana<sup>(21)</sup>. En el presente estudio, aparentemente, a pesar de que la dosis total por semana es la misma, las concentraciones de MTX-PG3 en el grupo de pacientes en temporalidad semanal alcanzan el equilibrio dinámico después de 24 semanas en tratamiento.

### **7.8 Influencia del índice de masa corporal sobre las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3.**

Los pacientes se clasificaron en dos grupos de acuerdo con el IMC;  $\leq 25$  Kg/m<sup>2</sup> (normopeso);  $>25$  Kg/m<sup>2</sup> (sobrepeso u obesidad). Las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 presentaron diferencias significativas a las 24 semanas con una mediana (rango intercuartílico) de 28 (17.95-45.15) nM y 10.35 (5.22-30.88) nM para el grupo de normopeso y sobrepeso u obesidad, respectivamente ( $p=0.02$ ) (Figura 7.9). De esta manera, se identificó al índice de masa corporal (IMC) como uno de los principales factores antropométricos que afectan las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3. Takahashi y cols., (2017) también encontraron un efecto del IMC sobre el total de las concentraciones de MTX-PGn a las 12 y 24 semanas ( $p=0.006$  y  $p=0.002$ ), respectivamente<sup>(27)</sup>.

Se ha descrito una relación entre el IMC y los niveles de glóbulos rojos en población adulta.<sup>(57)</sup>, e inclusive se ha asociado a la obesidad con concentraciones elevadas de folato en glóbulos rojos<sup>(58, 59)</sup>. Con base a lo anterior, las bajas concentraciones de MTX-PG3 identificadas en los pacientes con sobrepeso u obesidad de este estudio, tendrían explicación con la cuenta de glóbulos rojos. Dado que el MTX ingresa a los eritrocitos, una vez en el espacio intracelular, el aumento de folato podría causar un efecto de desplazamiento lo que reduciría la formación de MTX-PGn<sup>(58)</sup>.

Otros factores pueden afectar las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PGn. A través de un análisis univariado, Stamp y cols., (2009) encontraron que la edad, la función renal y la dosis del fármaco están asociados con la variabilidad en las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PGn.<sup>(56)</sup>



**Figura 7.9** Concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 (nM) vs tiempo (semanas), de acuerdo con el IMC. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartílico.

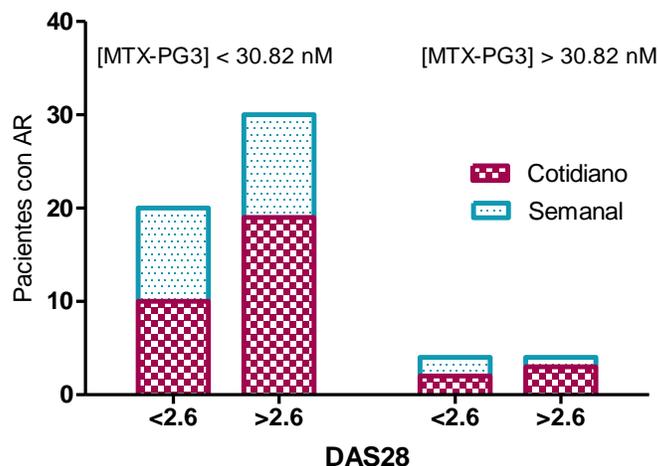
### 7.9 Remisión de la enfermedad.

El principal objetivo del tratamiento para la AR es lograr la remisión de la enfermedad, por lo cual, la mayoría de las guías clínicas para el tratamiento de la AR, establecen un puntaje  $DAS28 < 2.6$  como un estado de remisión<sup>(9, 35)</sup>. Sin embargo, se ha descrito que la diferencia del DAS28 inicial con respecto al valor a las 12 y 24 semanas en tratamiento menor a 1.2 ( $\Delta DAS28 > 1.2$ ) es considerada un punto de corte más estricto<sup>(17)</sup>.

En el presente estudio, a las 6 semanas del tratamiento, 8.8% de los pacientes en temporalidad cotidiana y 8.5% pacientes en temporalidad semanal lograron  $\Delta DAS28 > 1.2$ , con una concentración intraeritrocitaria promedio de MTX-PG3 de 6.0 y 8.45 nM, respectivamente. Después de 12 semanas, 38.24% pacientes en temporalidad cotidiana y 29.17% de pacientes en temporalidad semanal consiguieron un  $\Delta DAS28 > 1.2$  con respecto al valor inicial, con concentraciones promedio de MTX-PG3 de 11.27 y 13.81 nM. Finalmente, a las 24 semanas 29.03% de pacientes en temporalidad cotidiana y 23.53% en temporalidad semanal lograron la disminución de  $\Delta DAS28 > 1.2$ , con concentraciones intraeritrocitarias promedio de MRX-PG3 de 22.81 y 27.08 nM, respectivamente.

Murosaki y cols., (2016) examinaron la posibilidad de predecir una respuesta clínica a las 24 semanas empleando un punto de corte de  $> 30.82$  nM para lograr una disminución del  $\Delta DAS28 > 1.2$ <sup>(26)</sup>. Por lo anterior, se evaluó la eficacia del MTX a las 24 semanas por cada temporalidad de dosis, considerando el criterio anterior a las 12 semanas. Sin embargo,

en nuestro estudio no se observó una asociación entre la remisión de la enfermedad a las 24 semanas y las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 >30.82 nM ( $p=0.702$ ), tal como se muestra en la Figura 7.10.



**Figura 7.10** Evolución clínica con base a la diferencia del DAS28 por temporalidad del tratamiento con MTX después de 12 semanas en pacientes con AR.

Por otra parte, se evaluó la remisión de la enfermedad a las 24 semanas. En los pacientes que lograron una disminución del puntaje de DAS28 <2.6 la concentración de MTX-PG3 fue  $27.34 \pm 25.90$  nM, mientras que para los pacientes que no lograron la remisión con un puntaje de DAS28 >2.6 fue de  $13.62 \pm 11.13$  nM.

A través del conjunto de todos los resultados del presente trabajo, se demostró que tanto el tratamiento cotidiano como el semanal con MTX en pacientes con AR de recién diagnóstico, ofrecieron la misma eficacia clínica y desarrollo de eventos adversos; así mismo, la producción eritrocitaria del metabolito MTX-PG3 no difirió entre ambos esquemas de dosificación (Tabla 7.7).

**Tabla 7.7** Resultados generales

Variable	$p^*$
Articulaciones inflamadas	0.950
Articulaciones dolorosas	0.731
EVA	0.244
VSG (mm/h)	0.823
Leucocitos (células/ $\mu$ L)	0.784
MTX-PG3 (nM)	0.941
Eventos adversos*	0.387

Análisis estadístico empleado: ANOVA de dos vías, \*prueba de  $X^2$

## **LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS**

Se consiguieron los objetivos del estudio al comprobar que los resultados con la dosis semanal y cotidiana no difieren significativamente entre sí. Sin embargo, se considera que fue limitado el número de pacientes en temporalidad semanal que completó su participación en el protocolo. Por otro lado, no fue posible establecer una asociación entre los niveles eritrocitarios de MTX-PG5 y la presencia de eventos adversos con la evolución clínica de la enfermedad, esto último debido a las limitaciones de la técnica analítica implementada para cuantificar este metabolito.

Para futuras investigaciones sobre el tema, se sugiere incluir el estudio de los polimorfismos en los genes que codifican las enzimas y proteínas transportadoras de MTX, las cuales pueden ser un factor que modifique las concentraciones intraeritrocitarias de los MTX-PGs.

## **8. CONCLUSIONES**

Bajo las condiciones clínicas y experimentales realizadas en el presente estudio, la eficacia clínica durante los primeros 6 meses de tratamiento en pacientes con recién diagnóstico AR es similar al administrar MTX bajo el esquema de dosificación cotidiano o semanal.

Los resultados sugieren que el esquema de dosificación cotidiano facilita el apego al tratamiento con MTX al aumentar la frecuencia de la administración sin modificar la dosis total por semana, aspecto que podría contribuir a la disminución de los errores de medicación asociados a la administración semanal de este fármaco.

Las concentraciones intraeritrocitarias de MTX-PG3 presentaron amplia variabilidad interindividual independientemente del tipo de dosificación. No se encontraron diferencias significativas entre dichas concentraciones con ambos tratamientos, pero se observó mayor fluctuación en los niveles obtenidos con el esquema de dosificación semanal, lo que podría estar relacionado con la aparición de eventos adversos que conduce a los pacientes al abandono del tratamiento.

Los resultados de este estudio contribuirán a optimizar las pautas de dosificación que faciliten la adherencia al tratamiento para lograr una adecuada remisión de la AR en los pacientes que reciben MTX con menor frecuencia de eventos adversos.

## 9. REFERENCIAS

1. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*. 2017;46(2):183-96.
2. Alam J, Jantan I, Bukhari SNA. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;92:615-33.
3. Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Sanin LH, Pérez-Barbosa L, Trejo-Valdivia B, Santana N, et al. Association of regional and cultural factors with the prevalence of rheumatoid arthritis in the Mexican population: a multilevel analysis. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*. 2015;21(2):57-62.
4. Mendoza CA. Consideraciones a las recomendaciones terapéuticas para la artritis reumatoide. *Reumatología clínica*. 2015;11(4):193-5.
5. Jayaraj K, Alvin TG, Charles KS, Antony T. Correlation of ocular manifestations with the duration and activity of disease in patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Medical Science and Public Health*. 2017;6(1):34-8.
6. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio A, Puxeddu I, Alunno A. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(2):175-84.
7. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinica Chimica Acta*. 2016;455:161-71.
8. Cardiel MH, Díaz-Borjón A, del Mercado Espinosa MV, Gámez-Nava JI, Fabris LAB, Tena CP, et al. Actualización de la guía mexicana para el tratamiento farmacológico de la artritis reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología. *Reumatología Clínica*. 2014;10(4):227-40.
9. Balsa A. Definiendo la remisión en la artritis reumatoide: nuevos criterios de la ACR/EULAR. *Reumatologia clinica*. 2011;6:12-5.
10. Bello AE, Perkins EL, Jay R, Efthimiou P. Recommendations for optimizing methotrexate treatment for patients with rheumatoid arthritis. *Open access rheumatology: research and reviews*. 2017;9:67.
11. Korell J, Stamp LK, Barclay ML, Dalrymple JM, Drake J, Zhang M, et al. A population pharmacokinetic model for low-dose methotrexate and its polyglutamated metabolites in red blood cells. *Clinical pharmacokinetics*. 2013;52(6):475-85.
12. Den Boer EE. Therapeutic drug-monitoring of methotrexate-polyglutamates in rheumatoid arthritis. Proefschrift, editor. Erasmus Universiteit Rotterdam 2014.

13. Grim J, Chládek J, Martínková J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clinical pharmacokinetics*. 2003;42(2):139-51.
14. Yoshioka Y, Katayama K, Kasama T, Sato M, Ohno S, Amasaki Y, et al. SAT0258 Weekly split dose compared with single dose oral methotrexate reduced polyglutamylation in red blood cells and increased the risk of adverse events in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2018;77(Suppl 2):992-.
15. Rau R, Herborn G. Benefit and risk of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2004;22:S83-S94.
16. Cairns R, Brown JA, Lynch AM, Robinson J, Wylie C, Buckley NA. A decade of Australian methotrexate dosing errors. *Medical Journal of Australia*. 2016;204(10):384-.
17. Horta-Baas G, Bolde-Hernández AP, Hernández-Cabrera MF, Vergara-Sánchez I, del Socorro Romero-Figueroa M. Evaluación de la actividad de la artritis reumatoide en la atención clínica habitual. Concordancia entre la autoclínimetría y la evaluación clínica con los índices de actividad: DAS28, CDAI y SDAI. *Medicina Clínica*. 2017;149(7):293-9.
18. Garcia N, Massanés M. Casos graves de intoxicación con metotrexato oral. *Boletín de Prevención de Errores de Medicación de Cataluña*. 2013;11:1-4.
19. Luis M, Pacheco-Tena C, Cazarín-Barrientos J, Lino-Pérez L, Victoria Goycochea M, Vázquez-Mellado J, et al. Comparison of two schedules for administering oral low-dose methotrexate (weekly versus every-other-week) in patients with rheumatoid arthritis in remission: A twenty-four-week, single-blind, randomized study. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1999;42(10):2160-5.
20. Braun J. Methotrexate: optimizing the efficacy in rheumatoid arthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2011;3(3):151-8.
21. Goss SL, Klein CE, Jin Z, Locke CS, Rodila RC, Kupper H, et al. Methotrexate dose in patients with early rheumatoid arthritis impacts methotrexate polyglutamate pharmacokinetics, adalimumab pharmacokinetics, and efficacy: pharmacokinetic and exposure-response analysis of the CONCERTO Trial. *Clinical therapeutics*. 2018;40(2):309-19.
22. Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Barclay ML. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2008;58(11):3299-308.

23. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12(12):731.
24. Chan ES, Cronstein BN. Methotrexate—how does it really work? *Nature Reviews Rheumatology*. 2010;6(3):175.
25. Danila MI, Hughes LB, Brown EE, Morgan SL, Baggott JE, Arnett DK, et al. Measurement of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels: ready for clinical use in rheumatoid arthritis? *Current rheumatology reports*. 2010;12(5):342-7.
26. Murosaki T, Nagatani K, Sato T, Akiyama Y, Ushijima K, Lefor AK, et al. Prediction of the therapeutic response to methotrexate at 24 weeks by methotrexate–polyglutamates concentration in erythrocytes at 8 weeks in patients with rheumatoid arthritis. *Modern rheumatology*. 2017;27(3):411-6.
27. Takahashi C, Kaneko Y, Okano Y, Taguchi H, Oshima H, Izumi K, et al. Association of erythrocyte methotrexate-polyglutamate levels with the efficacy and hepatotoxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: a 76-week prospective study. *RMD open*. 2017;3(1):e000363.
28. Restrepo LF, Giraldo R, Londoño J, Pinzón C, Cortes A, Ballesteros G, et al. Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide. Revisión sistemática. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2016;23(2):102-14.
29. Pandya S, Aggarwal A, Misra R. Methotrexate twice weekly vs once weekly in rheumatoid arthritis: a pilot double-blind, controlled study. *Rheumatology international*. 2002;22(1):1-4.
30. Kremer JM, Davies JM, Rynes RI, Fink S, Lawrence DA, Petrillo GF, et al. Every-other-week methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1995;38(5):601-7.
31. Simonson W. Daily methotrexate can be lethal! *Geriatric Nursing*. 2015;36(3):224-5.
32. Valverde MP, Martín R. Seguridad de medicamentos: prevención de errores de medicación. *Farm Hosp*. 2001;25(6):376-9.
33. Radmanesh M, Rafiei B, Moosavi ZB, Sina N. Weekly vs. daily administration of oral methotrexate (MTX) for generalized plaque psoriasis: a randomized controlled clinical trial. *International journal of dermatology*. 2011;50(10):1291-3.
34. Vítolo F, Médico-NOBLE S. Medicamentos de alto riesgo. Disponible en: URL [http://www.nobleseguros.com/ARTICULOS\\_NOBLE/77.pdf](http://www.nobleseguros.com/ARTICULOS_NOBLE/77.pdf); 2012.

35. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(6):960-77.
36. Calasan MB, van den Bosch OF, Creemers MC, Custers M, Heurkens AH, van Woerkom JM, et al. Prevalence of methotrexate intolerance in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(6):R217.
37. Camacho-Sandoval J. Tamaño de muestra en estudios clínicos. *Acta Médica Costarricense*. 2008;50(1):20-1.
38. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2005;4(3):130-6.
39. Thyberg I, Dahlström Ö, Björk M, Stenström B, Adams J. Hand pains in women and men in early rheumatoid arthritis, a one year follow-up after diagnosis. The Swedish TIRA project. *Disability and rehabilitation*. 2017;39(3):291-300.
40. Lima ÁRNP. Methotrexate pharmacogenomics and predictors of therapeutic outcome in rheumatoid arthritis. 2014.
41. Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Silman AJ, Barrett EM, et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis. Results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1997;40(11):1955-61.
42. González ML, Rueda J, González H, Cantor E, Martínez A. Artritis reumatoide temprana: resultados clínicos y funcionales de una cohorte en un centro de alta complejidad, Cali-Colombia. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2016;23(3):148-54.
43. Crowson CS, Matteson EL, Davis III JM, Gabriel SE. Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. *Arthritis care & research*. 2013;65(1):71-7.
44. Van Gestel A, Prevoo M, Van't Hof M, Van Rijswijk M, Van de Putte L, Van Riel P. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis: comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism criteria. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 1996;39(1):34-40.
45. Anderson JK, Zimmerman L, Caplan L, Michaud K. Measures of rheumatoid arthritis disease activity: Patient (PtGA) and Provider (PrGA) Global Assessment of

Disease Activity, Disease Activity Score (DAS) and Disease Activity Score with 28-Joint Counts (DAS28), Simplified Disease Activity Index (SDAI), Clinical Disease Activity Index (CDAI), Patient Activity Score (PAS) and Patient Activity Score-II (PASII), Routine Assessment of Patient Index Data (RAPID), Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index (RADAI) and Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index-5 (RADAI-5), Chronic Arthritis Systemic Index (CASI), Patient-Based Disease Activity Score With ESR (PDAS1) and Patient-Based Disease Activity Score without ESR (PDAS2), and Mean Overall Index for Rheumatoid Arthritis (MOI-RA). *Arthritis care & research*. 2011;63(S11):S14-S36.

46. Naranjo LAG, Restrepo JFM. Evaluación de la inflamación en el laboratorio. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2010;17(1):35-47.

47. Diaz JMP, Pineda CLF, Amaya RM, Ariza WAC, Blanco SJG, Castellanos LB, et al. Caracterización clínica de los pacientes con artritis reumatoide en un hospital universitario en Colombia. *Medicina*. 2018;40(1):130-1.

48. Bull B, Caswell M, Ernst E, Jou J, Kallner A, Koepke J, et al. ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation-rate. *Journal of Clinical Pathology*. 1993;46(3):198-203.

49. Hernandez-Baldizon S. ¿ Cómo hacer buen uso del metotrexato en artritis reumatoide? *Reumatología Clínica*. 2012;8(1):42-5.

50. Fatimah N, Salim B, Nasim A, Hussain K, Gul H, Niazi S. Frequency of methotrexate intolerance in rheumatoid arthritis patients using methotrexate intolerance severity score (MISS questionnaire). *Clinical rheumatology*. 2016;35(5):1341-5.

51. Castro RO, Contreras AE, Gutiérrez JC, Villegas MdCC, Estévez EC. Óptima utilización del metotrexato. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*. 2013;14(1):24-7.

52. Dahl M, Gregory M, Scheuer P. Methotrexate hepatotoxicity in psoriasis—comparison of different dose regimens. *Br Med J*. 1972;1(5801):654-6.

53. Van Ede AE, Laan RF, Rood MJ, Huizinga TW, Van De Laar MA, Denderen CJV, et al. Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: A forty-eight-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2001;44(7):1515-24.

54. SSA. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que

deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. 2013.

55. de Rotte MC, Den Boer E, de Jong PH, Pluijm SM, Calasan MB, Weel AE, et al. Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74(2):408-14.

56. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Frampton C, James J, et al. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2009;60(8):2248-56.

57. Chmielewski P, Strzelec B, Chmielowiec J, Chmielowiec K, Boryslawski K. Association between body size and selected hematological parameters in men and women aged 45 and above from a hospitalized population of older adults: an insight from the Polish Longitudinal Study of Aging (1960–2000). *AnthropologicAI review*. 2017;80(2):171-90.

58. Denimal D, Brindisi M-C, Lemaire S, Duvillard L. Assessment of folate status in obese patients: Should we measure folate in serum or in red blood cells? *Obesity surgery*. 2016;26(12):3069-75.

59. Brooks AJ, Begg EJ, Zhang M, Frampton CM, Barclay ML. Red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in inflammatory bowel disease. *Therapeutic drug monitoring*. 2007;29(5):619-25.

# **ANEXOS**

## ANEXO II

### CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE ARTRITIS REUMATOIDE

Conjunto de variables y puntuación de cada una de las variables para el cómputo global.  
Un paciente será clasificado de AR si la suma total es igual o superior a 6.

Afectación articular	Puntaje
1 articulación grande afectada	0
2- 10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4- 10 articulaciones pequeñas afectadas	3
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
Serología	
FR y ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivos bajos (< 3 VN)	2
FR y/o ACPA positivos altos (>3 VN)	3
Reactantes de fase aguda	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
Duración	
<6 semanas	0
6 semanas	1

\*ACPA: Anticuerpos contra péptidos citrulinados; FR: Factor reumatoide; PCR: Proteína C reactiva; VN: Valor normal; VSG: Velocidad de sedimentación globular.