

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

TÍTULO DEL TRABAJO:

***“Factores farmacocinéticos y farmacogenéticos asociados con la remisión de Artritis Reumatoide en pacientes tratados con Metrotexato”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**PRESENTA**

MC. ANA PATRICIA HUERTA GARCÍA

Director de tesis

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia

Co-director

Dra. Silvia Romano Moreno

Asesores internos

Dra. Susanna Edith Medellín Garibay

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Asesor externo:

Dr. Luis Guillermo Llorente Peters



San Luis Potosí, S.L.P

Febrero, 2021

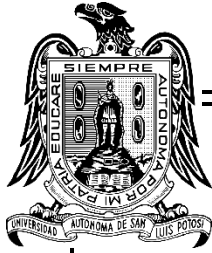
Proyecto realizado en:

- Departamento de Reumatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”
- Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



El programa de Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT registro 003383.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 331463.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

TÍTULO DEL TRABAJO:

***“Factores farmacocinéticos y farmacogenéticos asociados con la remisión de Artritis Reumatoide en pacientes tratados con Metrotexato”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**PRESENTA**

MC. ANA PATRICIA HUERTA GARCÍA

COMITÉ TUTORIAL

Director de tesis

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia \_\_\_\_\_

Co-director

Dra. Silvia Romano Moreno \_\_\_\_\_

Asesores internos

Dra. Susanna Edith Medellín Garibay \_\_\_\_\_

Dra. Diana Patricia Portales Pérez \_\_\_\_\_

Asesor externo

Dr. Luis Guillermo Llorente Peters \_\_\_\_\_



San Luis Potosí, S.L.P

Febrero, 2021



Factores farmacocinéticos y farmacogenéticos asociados con la remisión de Artritis Reumatoide en pacientes tratados con Metotrexato por Ana Patricia Huerta-García se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## SUBCOMITÉ TUTORIAL

### Asesores Clínicos

- Dr. Carlos Abud Mendoza.  
Adscripción: Departamento de Reumatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.
- Dr. Marco Ulises Martínez Martínez.  
Adscripción: Departamento de Reumatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

*Dedicada a mis padres, Paty y Héctor;  
a mis hermanas Ady, Gaby y Ale;  
a mis sobrinos Carito y Héctor  
y a mi compañero de vida Jorge.*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A Dios por permitirme llegar a este punto en mi vida, y poner en mi camino a personas excepcionales que me han formado académica y profesionalmente.
- A toda mi familia que es lo más importante en mi vida.
- A Jorge, que siempre está dispuesto a apoyarme.
- A la Dra Rosy, Dra Silvia y Dra. Diana, quienes han sido pilar fundamental en mi desarrollo profesional.
- A Susy, quien me ha enseñado que la perseverancia es la base del éxito.
- A Coco, que más que compañera de proyecto es una verdadera amiga.
- A todos los del departamento de Reumatología, el Dr. Abud por permitirme acceder al departamento, al Dr. Marco por siempre mostrar interés en el proyecto, a todos los residentes que siempre apoyaban en facilitarme los datos que requería, a Esme y la Dra. Baranda que hacían más amenas las mañanas de consulta en Reumatología.
- A los 120 pacientes que accedieron a participar en este estudio y confiaron en mí.

## RESUMEN

El metotrexato, tratamiento de primera elección para artritis reumatoide, se distribuye e internaliza en diversas células donde, por acción de la enzima folipoliglutamato sintetasa, se le añaden residuos de glutamato generando poliglutamatos. El triglutamato de metotrexato es la forma más estable y ha sido previamente relacionado con el efecto antiinflamatorio por su afinidad a las enzimas implicadas en la síntesis de pirimidinas y purinas. La determinación de la relación entre las concentraciones de triglutamato de metotrexato y la evolución clínica en pacientes con artritis reumatoide, así como la identificación de los factores asociados a la variabilidad intracelular del metabolito, son aspectos que podrían integrarse en la clínica para coadyuvar en la eficacia del tratamiento. En este estudio se abordaron ambos objetivos para lo cual se incluyeron pacientes con diagnóstico reciente de artritis reumatoide y en tratamiento con metotrexato. La cuantificación de la concentración de triglutamato de metotrexato en glóbulos rojos se realizó mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem. Los polimorfismos de un solo nucleótido de las enzimas y las proteínas transportadoras implicadas en la formación de poliglutamatos se determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Participaron 120 pacientes. El 95% fueron mujeres con edad promedio de  $45.8 \pm 10.9$  años y en su mayoría con sobrepeso y obesidad (29% y 35%, respectivamente). Al comparar la actividad de la enfermedad antes y tras 24 semanas bajo tratamiento con metotrexato, se observó una disminución estadísticamente significativa ( $5.4 \pm 1.2$  vs  $3.9 \pm 1.0$ ,  $p < 0.05$ ), la cual está inversamente relacionada con las concentraciones de triglutamato de metotrexato ( $p = 0.003$ ). Entre las características que se asociaron a los niveles de triglutamato de metotrexato se encuentran el conteo de glóbulos rojos ( $p < 0.005$ ), el índice de masa corporal ( $p < 0.001$ ) y el polimorfismo rs1544105 de la enzima folipoliglutamato sintetasa ( $p < 0.05$ ). Las características anteriores pueden estar asociados con la respuesta al metotrexato en pacientes con artritis reumatoide, y, por tanto, con la remisión temprana de la enfermedad.

Palabras clave: metotrexato, poliglutamatos de metotrexato, artritis reumatoide, DAS28.

## ABSTRACT

Methotrexate is the first-line treatment for rheumatoid arthritis and it is distributed and internalized in various cells where by the action of the enzyme folipoliglutamate synthetase is transformed into polyglutamates. Methotrexate triglutamate is the most stable form, which has been previously associated with the anti-inflammatory effect of the drug due to its affinity to the enzymes involved in the synthesis of pyrimidines and purines. The determination of the relationship between methotrexate triglutamate concentrations and the clinical evolution in patients with rheumatoid arthritis, as well as factors associated with the intracellular variability of the metabolite, could be integrated in the clinic, to optimize the efficacy of the treatment. This study included patients with a recent diagnosis of rheumatoid arthritis under treatment with low-dose methotrexate. The quantification of methotrexate triglutamate concentration in red blood cells was developed through ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Single nucleotide polymorphisms of enzymes and transporter proteins involved in the formation of polyglutamates were determined by real time polymerase chain reaction. A total of 120 patients were included in this study, mainly women (95%) with a mean age of 45.8 ( $\pm$  10.9) years and mostly overweight and obese patients (29% and 35%, respectively). The disease activity evaluated before and after 24 weeks under treatment, significantly decreased ( $5.4 \pm 1.2$  vs  $3.9 \pm 1.0$ ,  $p < 0.05$ ) and was inversely related to methotrexate triglutamate concentrations ( $r = -0.254$ ,  $p = 0.003$ ). Among the characteristics associated with methotrexate triglutamate concentrations were the red blood cells count ( $p < 0.005$ ), the body mass index ( $p < 0.001$ ) and the polymorphism rs1544105 of the enzyme folipoliglutamate synthetase ( $p < 0.05$ ). These characteristics could be associated with the response to low-dose methotrexate in patients with new diagnosis of reumathoid arthritis and, therefore, with the early remission of the disease.

Key words: Methotrexate, methotrexate polyglutamates, rheumatoid arthritis, DAS28.



## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.1 Objetivos específicos .....	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	4
3.1 Genotipificación.....	4
3.2 Concentraciones intraeritrocitarias de PG3 y PG5.....	4
3.3 Recolección de datos clínicos .....	5
3.4 Análisis estadístico.....	5
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	6
4.1 Características generales.....	6
4.2 Concentraciones intraeritrocitarias de PG3 y PG5.....	7
4.3 Evolución clínica (DAS28-VDG).....	7
4.4 Asociaciones estadísticas.....	7
4.5 Modelo poblacional y recomendación de dosis inicial.....	8
5. CONCLUSIONES.....	9
6. BIBLIOGRAFÍA.....	9
<b>ANEXO 1:</b> “ <i>Methotrexate triglutamate as a determinant of clinical response in Mexican patients with rheumatoid arthritis: Pharmacokinetics and dose recommendation</i> ” .....	11
<b>ANEXO 2:</b> “ <i>Disease activity and therapeutic drug monitoring of low-dose methotrexate administered daily or weekly in patients with rheumatoid arthritis</i> ” .....	14

## ***“Factores farmacocinéticos y farmacogenéticos asociados con la remisión de Artritis Reumatoide en pacientes tratados con Metrotexato”***

### **1. INTRODUCCIÓN**

El metrotexato (MTX) es el fármaco de primera elección en la terapia contra artritis reumatoide (AR) cuyo objetivo es disminuir la inflamación sinovial que conlleve a mejorar la calidad de vida del paciente. Entre las herramientas clínicas para determinar la actividad de la enfermedad, se encuentra el DAS28 (*Disease Activity Score*, por sus siglas en inglés), de manera que los pacientes son identificados según el puntaje obtenido: con alta actividad ( $DAS28 > 5.1$ ), actividad moderada ( $3.2 < DAS28 \leq 5.1$ ), baja actividad ( $2.4 < DAS28 \leq 3.2$ ) o remisión clínica de la enfermedad ( $DAS28 \leq 2.4$ ). La EULAR (*European League Against Rheumatism*, por sus siglas en inglés) ha establecido que la respuesta al tratamiento puede ser evaluada por los cambios en el DAS28 ( $\Delta DAS28$ ) desde el diagnóstico hasta los 12 meses de tratamiento. Los pacientes se clasifican como buenos respondedores si presentan un  $\Delta DAS28 > 1.2$ , respondedores moderados con  $0.6 < \Delta DAS28 \leq 1.2$  o no respondedores  $\Delta DAS28 \leq 0.6$ <sup>1</sup>.

MTX se absorbe en el intestino y posteriormente ingresa a los glóbulos rojos, células blancas, hepatocitos, sinoviocitos y otras células a través del transportador de folato (RFC1 o SLC19A1). El MTX se une a residuos de glutamato por acción de la enzima folipoliglutamato sintetasa (FPGS), proceso que produce moléculas más grandes llamadas poliglutamatos (PGs), los cuales presentan un tiempo de vida media de eliminación de 1.2 a 4.3 semanas, siendo el PG3 el predominante y el PG5 el de mayor orden de glutamación<sup>2</sup>. Los PGs impiden que el MTX sea expulsado de la célula y, a su vez, presentan afinidad para inhibir las enzimas dihidrofolato reductasa, timidilato sintasa y amino-imidazol carboxamidoribonucleotido transdormilasa, lo que interrumpe la síntesis de pirimidinas y purinas e inhibe la producción de ADN, ARN y proteínas; con ello se produce una disminución de la producción de citocinas proinflamatorias. Los residuos de glutamatos añadidos al MTX se remueven por la enzima gamma-glutamil hidrolasa (GGH), lo que permite la recuperación del MTX a

su forma original (sin actividad inhibitoria) para ser transportado hacia el exterior de las células mediante las proteínas de eflujo de la familia ABCB1<sup>3</sup>.

Diversos factores impiden que el tratamiento sea completamente efectivo ya que se registra una amplia variabilidad en la respuesta clínica evaluada por disminución del DAS28. De 30 a 40% de los pacientes con AR que reciben MTX, no responden al tratamiento y presentan daño irreversible en las articulaciones con posibles limitaciones funcionales; por consiguiente, se observa remisión después de 3 meses de tratamiento. Lo anterior implica incluir otros fármacos modificadores de la enfermedad o aplicar terapias biológicas o inclusive, cambio de fármaco; lo anterior provoca un retraso en la respuesta esperada con deterioro funcional<sup>4</sup>.

Las concentraciones de PGs han sido previamente asociados con cambios en la actividad de la enfermedad; de Rotte y cols., al medir las concentraciones de PGs (1 al 5) a los 3, 6 y 9 meses bajo tratamiento con MTX, encontraron que el incremento de la concentración de éstos se asocia con la disminución de la puntuación del DAS28<sup>5</sup>. Resultados similares encontraron Murosaki y cols., en un grupo de 42 pacientes con AR al demostrar que los PGs se encontraron en menor concentración en pacientes con baja respuesta al tratamiento<sup>6</sup>. Por lo tanto, la medición de PGs en células rojas, se considera un potencial indicador y predictor de la eficacia de MTX.

Alrededor de 30% de la variabilidad interindividual en las concentraciones de PGs está influenciada por la edad, la función renal y la dosis de MTX. La duración de la terapia, tabaquismo y medicación concomitante también intervienen en las concentraciones intracelulares de PGs, así como la concentración de folato intracelular<sup>3,7</sup>. Las variables antropométricas y clínicas anteriormente mencionadas explican parte de la amplia variabilidad en las concentraciones intracelulares de PGs así como la falta de respuesta terapéutica y de la remisión de la enfermedad en algunos pacientes.

Por otro lado, se ha propuesto que los polimorfismos en los genes que codifican las enzimas y proteínas transportadoras de MTX, pueden considerarse como potenciales predictores de la concentración intracelular de PGs y por ende de la respuesta y efectos adversos en la terapia con MTX<sup>8,9</sup>.

Con base a lo anterior, se ha propuesto que las concentraciones intraeritrocitarias de los PGs de MTX constituyan una guía para el tratamiento de la AR y lograr la remisión de la enfermedad en estos pacientes.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el comportamiento farmacocinético de los PGs en pacientes mexicanos diagnosticados con AR y tratados con MTX para desarrollar un modelo poblacional de efectos mixtos mediante la utilización del programa farmacoestadístico NONMEM, el cual permita cuantificar la variabilidad inter e intra-individual con base a las características genéticas, antropométricas, clínicas y de comedicación de cada paciente y su relación con la respuesta al tratamiento medido con el índice DAS28.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Implementar y validar una técnica por cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-masas) para la determinación de las concentraciones intracelulares de los PG 3 y 5 en glóbulos rojos.
- Determinar los genotipos de las proteínas RFC1/SLC19A1, FPGS, GGH y ABCB1 para cada paciente.
- Determinar las concentraciones eritrocitarias de PG3 y PG5 en pacientes con AR y asociarlas con variables clínicas, antropométricas y genéticas. Así como determinar la relación de las concentraciones de PG3 y PG5 con la actividad de la enfermedad determinado por el DAS28.
- Desarrollar y validar un modelo farmacocinético poblacional específico para PG3 y PG5, para determinar una dosis inicial basada en las características poblacionales.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en el Departamento de Reumatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” y en el Lab. de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Central (registro 02-17). Mediante un muestreo no probabilístico consecutivo se incluyeron pacientes mayores de 18 años, recién diagnosticados con AR que iniciaran su tratamiento con dosis bajas de MTX por vía oral y con autorización de su inclusión en el estudio mediante firma del consentimiento informado.

#### **3.1 Genotipificación**

Para la extracción y análisis de DNA genómico de RFC1/SLC19A1, FPGS, GGH y ABCB1, a cada paciente se le tomó una muestra sanguínea de 4 mL en tubo vacutainer™ con EDTA al iniciar el tratamiento con MTX. La extracción de DNA se realizó con un kit comercial Wizard Promega®. La prueba de genotipificación por la técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*, por sus siglas en inglés) en tiempo real, se realizó en un equipo StepOne (Applied Biosystems). Con las siguientes sondas Taqman (Applied Biosystems) se determinaron los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs): rs1045642 para la proteína ABCB1, rs1051296 para el transportador SLC19A1, rs12681874 para la enzima GGH y rs 1544105 para la enzima FPGS.

#### **3.2 Concentraciones intraeritrocitarias de PG3 y PG5.**

Para la determinación de PG3 y PG5 en glóbulos rojos, se tomaron muestras sanguíneas de 4 mL en un tubo vacutainer™ con EDTA, a cada paciente ambulatorio mediante venopunción en 24 horas después de la última dosis de MTX. Este procedimiento se realizó a las 6, 12 y 24 semanas de tratamiento.

Se obtuvo el paquete globular de cada muestra y se almacenó a -80°C hasta su análisis por UPLC-masas. A 150 µL del paquete globular se agregaron 150 µL de ácido tricloroacético al 10% y posterior a una centrifugación se inyectó; el sobrenadante en un equipo Acquity UPLC clase H acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (XEVO TQD), Waters®. La separación cromatográfica se realizó en una columna HSS T3, mediante un sistema de bombeo en gradiente de 6 minutos y flujo de 0.3 mL/min con fase móvil compuesta por bicarbonato de amonio 10mM y acetonitrilo. La

detección del PG3 y PG5 en espectrometría de masas se realizó por electrospray en modo de ionización positiva con un voltaje de cono de 37 V para PG3 y 46 V para PG5. Se realizó la monitorización de reacciones múltiples (MRM) para la identificación y cuantificación de PG3 y PG5 con las transiciones  $m/z$  712.3>308.11 y 970>75.05  $m/z$  con una energía de colisión de 36 y 55 eV, respectivamente.

El método cromatográfico fue validado con base a la NOM-177-SSA1-2013. El método fue lineal de 1.9 a 500 nM para PG3 y PG5, con límite de detección y cuantificación de 0.24 y 0.52 nM para PG3 y de 0.27 y 2.19 nM para PG5, respectivamente. La exactitud fue de 94.8% a 114% para PG3 y 98% a 112% para PG5; la repetibilidad y reproducibilidad para PG3 y PG5 se demostraron mediante controles de calidad con coeficientes de variación menores a 8.7% para PG3 y 9.8% para PG5.

### **3.3 Recolección de datos clínicos**

Del expediente de cada paciente se tomaron los datos antropométricos, datos de laboratorio tales como conteo de glóbulos rojos y leucocitos, concentraciones de hemoglobina, transaminasas hepáticas y creatinina sérica. Conteo de articulaciones dolorosas, de articulaciones inflamadas, velocidad de sedimentación globular (VSG) como marcador bioquímico de inflamación y la valoración del dolor por el paciente a través de la escala visual análoga, fueron herramientas para determinar el DAS28.

### **3.4 Análisis estadístico.**

La asociación estadística de las concentraciones intraeritrocitarias de PGs y de la actividad de la enfermedad (DAS28) se analizada mediante la prueba de Spearman para datos no paramétricos. La comparación estadística de las concentraciones intracelulares de PGs con las diferentes variables categóricas, se realizó por ANOVA de una vía con prueba de Tukey (post-hoc) en caso de datos con distribución normal (prueba Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett). Para datos no paramétricos se aplicó un ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba de Dunn (post-hoc). Se realizaron análisis de regresión univariada para variables continuas con el fin de correlacionar las concentraciones de PGs a través de la prueba de Pearson o

prueba de Spearman para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. El nivel de significancia fue de  $p \leq 0.05$ . Se empleó el programa SPSS versión 20.

Para el desarrollo del modelo farmacocinético, se utilizó el programa NONMEM, el cual se basa en la estimación de máxima verosimilitud, y está diseñado para ser acoplado a modelos estadísticos que incluyen efectos fijos y efectos aleatorios debidos a la variabilidad interindividual y el error residual. Se realizó una validación interna mediante técnicas de remuestreo o bootstrap, la cual permitió evaluar la estabilidad del modelo obtenido. La validación externa se efectuó con un grupo de pacientes no incluidos en la construcción del modelo poblacional.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Características generales.**

Participaron 120 pacientes en tratamiento con MTX, de los cuales 89 cumplieron 24 semanas de seguimiento. Predominó el sexo femenino (95%) con edad promedio ( $\pm$  desviación estándar) de 45.8 ( $\pm 10.9$ ) años e intervalo de peso de 38.5 a 118 Kg; según el índice de masa corporal (IMC), 2.5% presentaron bajo peso, 29% registró sobrepeso y 35% obesidad. Al iniciar el tratamiento con 12.5 mg semanales de MTX, los pacientes presentaron en promedio 10 articulaciones inflamadas y 10 articulaciones dolorosas, con dolor severo según la escala visual análoga. Se observó alta actividad inflamatoria inicial (DAS28 = 5.4). En el artículo "*Disease activity and therapeutic drug monitoring of low-dose methotrexate administered daily or weekly in patients with rheumatoid arthritis*" (en revisión en *Pharmacotherapy*, Anexo 2) se evaluó, la evolución de las articulaciones inflamadas, dolorosas, la percepción del dolor por el paciente y el DAS28. La dosis total semanal administrada a pacientes hasta las 6 semanas fue de 12.5 mg, mientras que la dosis aplicada posteriormente osciló de 7.5 mg hasta 20 mg. Sólo en 86 pacientes fue posible determinar genotipos de las proteínas y enzimas involucradas en el mecanismo de acción de los PGs. De acuerdo con la distribución genotípica, en el SNP para la proteína ABCB1 predominó el genotipo AG, seguido del GG y finalmente el de referencia AA en proporción de 53.5%, 34.9% y 11.6%,

respectivamente. Para el transportador SLC19A1, 41.9% de la población presentó el polimorfismo heterocigoto (AC), mientras que en 20.9% se identificó el genotipo polimórfico (CC) y el resto al genotipo de referencia (AA). La distribución genotípica del SNP rs12681874 para la enzima GGH mostró 58.1% de pacientes con el genotipo de referencia CC, mientras que el genotipo homocigoto polimórfico TT sólo estuvo representado en 2.3% de la población. Para la enzima FPGS, 46.5% presentó genotipo heterocigoto (CT), 27.9% el genotipo CC y 25.6% el genotipo TT.

#### **4.2 Concentraciones intraeritrocitarias de PG3 y PG5.**

Las concentraciones de PG5 fueron menores al límite inferior de cuantificación. La mediana (rango) de las concentraciones eritrocitarias de PG3 en la semana 6, 12 y 24 fue 6.8 (0.29, 37.9) nM, 12.9 (0.29, 71.4) nM y 16.5 (2.9, 156.5) nM, respectivamente.

#### **4.3 Evolución clínica (DAS28).**

En general, a lo largo del seguimiento se observó disminución de las articulaciones dolorosas e inflamadas y del DAS28. A las 6 semanas los pacientes presentaron un DAS28 promedio ( $\pm$ desviación estándar) de 4.88 ( $\pm$ 1.4); a las 12 semanas de tratamiento se observó disminución del DAS28 con valor de 4.08 ( $\pm$ 1.3); después de 24 semanas de seguimiento, el DAS28 se registró en 3.9 ( $\pm$ 1.0). Se encontró una disminución significativa del valor inicial de DAS28 frente al valor obtenido posterior a 24 semanas de tratamiento ( $p < 0.05$ ). Con base a la clasificación de la enfermedad, a las 12 semanas de tratamiento con MTX, 23.5% de los pacientes presentaron alta actividad ( $\text{DAS28} > 5.1$ ) y sólo el 9% presentaron remisión clínica ( $\text{DAS28} \leq 2.4$ ).

#### **4.4 Asociaciones estadísticas.**

Se encontró una correlación negativa entre las concentraciones de PG3 y los puntajes de DAS28 ( $r = -0.254$ ,  $p = 0.003$ ). Mohamed et al (2015), demostraron que la disminución de la actividad de la enfermedad está en función de las concentraciones de PGs, por lo que proponen la medición de estos metabolitos como indicador de la respuesta a MTX y de la remisión temprana de la enfermedad en pacientes con AR<sup>10</sup>.



Las concentraciones del PG3, presentaron una relación inversamente proporcional con la cantidad de glóbulos rojos ( $p < 0.005$ ). El IMC fue identificado como un factor asociado con las concentraciones de PG3; pacientes con bajo peso presentaron concentraciones medias de 61.2 nM, en pacientes con normo-peso y sobrepeso se observó una concentración media de 17.5 nM, mientras que los pacientes con obesidad presentaron concentraciones medias de 12.3 nM ( $p < 0.001$ ). Estos datos fueron similares a los reportados por Takahashi et al (2017), los cuales asociaron que, en la semana 12, a mayor IMC menor concentración de PGs ( $r = -0.318$ ,  $p = 0.006$ )<sup>11</sup>.

En lo que se refiere a los polimorfismos genéticos, el genotipo CC del polimorfismo rs1544105 asociado con la enzima FPGS, presentó menores concentraciones de PG3 en comparación con el genotipo TT (10.6 vs 16.8 nM,  $p < 0.05$ ). Yamamoto et al (2016), demostraron que pacientes con el genotipo TT mantienen mayores concentraciones que los genotipos CC y CT, considerando que el polimorfismo rs1544105 de la enzima FPGS es determinante para el manejo clínico de la terapia con MTX<sup>8</sup>.

#### **4.5 Modelo poblacional y recomendación de dosis inicial**

A través de un modelo monocompartimental se estimaron los valores poblacionales del aclaramiento (CL), volumen de distribución (Vd), constante de absorción (Ka) y fracción metabolizada (Fm) para PG3; el valor típico de CL (L/día) se determinó como  $1.45 * (\text{índice de masa corporal} / 28 \text{ Kg/m}^2) * (\text{conteo de glóbulos rojos} / 4.6 \times 10^6 \text{ células}/\mu\text{L})$ , Vd= 52.4 L, Ka=0.0346 días<sup>-1</sup> y fracción metabolizada de 1.03%. Con la aplicación de este modelo y considerando las características que influyen en el CL, se propuso la dosis inicial de MTX que permita obtener concentraciones de PG3 similares a las obtenidas por pacientes con buena respuesta ( $\Delta\text{DAS28} > 1.2$ ) a las 12 semanas de tratamiento con MTX. Los resultados de este estudio se describen en el artículo aceptado para publicación en la revista *The Journal of Clinical Pharmacology* titulado: “*Methotrexate triglutamate as a determinant of clinical response in Mexican patients with rheumatoid arthritis: Pharmacokinetics and dose recommendation*” (Anexo 1).

## 5. CONCLUSIONES

Las concentraciones de PG3 están relacionadas con la disminución de la actividad inflamatoria de la enfermedad (DAS28). La variabilidad en las concentraciones eritrocitarias de PG3 se asociaron con el IMC del paciente y con el polimorfismo en la enzima FPGS. Estas características pueden influir en la respuesta al MTX en pacientes con AR, y por tanto con la remisión temprana de la enfermedad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Moya Alvarado P, Laiz A. [Is DAS a profitable score to be used for rheumatoid arthritis patient follow up?]. *Reumatología clinica*. Sep-Oct 2011;7(5):336-338.
2. Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Barclay ML. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. Nov 2008;58(11):3299-3308.
3. Stamp LK, Barclay M. Therapeutic drug monitoring in rheumatic diseases: utile or futile? *Rheumatology*. Jun 2014;53(6):988-997.
4. Stamp LK, Barclay ML, O'Donnell JL, et al. Effects of changing from oral to subcutaneous methotrexate on red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. Dec 2011;38(12):2540-2547.
5. de Rotte MC, den Boer E, de Jong PH, et al. Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. Feb 2015;74(2):408-414.
6. Murosaki T, Nagatani K, Sato T, 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*. May 2017;27(3):411-416.
7. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, et al. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis and rheumatism*. Aug 2009;60(8):2248-2256.

8. Yamamoto T, Shikano K, Nanki T, Kawai S. Folylpolyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. *Scientific reports*. Oct 18 2016;6:35615.
9. den Boer E, de Rotte MC, Pluijm SM, Heil SG, Hazes JM, de Jonge R. Determinants of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. Nov 2014;41(11):2167-2178.
10. Mohamed HJ, Sorich MJ, Kowalski SM, et al. The role and utility of measuring red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in inflammatory arthropathies--a systematic review. *European journal of clinical pharmacology*. Apr 2015;71(4):411-423.
11. Takahashi C, Kaneko Y, Okano Y, 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.

**ANEXO 1: “*Methotrexate triglutamate as a determinant of clinical response in Mexican patients with rheumatoid arthritis: Pharmacokinetics and dose recommendation*”**

**Revista: The Journal of Clinical Pharmacology**

**DOI: 10.1002/jcph.1837**

# The Journal of Clinical Pharmacology

## Methotrexate triglutamate as a determinant of clinical response in Mexican patients with rheumatoid arthritis: Pharmacokinetics and dose recommendation

Journal:	<i>The Journal of Clinical Pharmacology</i>
Manuscript ID	JCP-20-Dec-554.R2
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Huerta-García, Ana Patricia; Universidad Autónoma de San Luis Potosí Rodríguez-Báez, Ana Socorro; Universidad Autónoma de San Luis Potosí Medellín-Garibay, Susanna Edith; Universidad Autónoma de San Luis Potosí Portales-Pérez, Diana Patricia; Universidad Autónoma de San Luis Potosí Martínez-Martínez, Marco Ulises; Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto Abud-Mendoza, Carlos; Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto Herrera-Van Oostdam, David; Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto Romano-Moreno, Silvia; Universidad Autónoma de San Luis Potosí Milán-Segovia, Rosa del Carmen; Universidad Autónoma de San Luis Potosí,
Keywords:	Clinical Pharmacology (CPH), Pharmacometrics, Population pharmacokinetics, Rheumatology, Therapeutic Drug Monitoring
Generic Drug Names:	
Abstract:	Methotrexate is the gold standard treatment in rheumatoid arthritis. Once absorbed, it is internalized in cells, where glutamate residues are added to produce polyglutamated forms which are responsible of the effect of methotrexate. The aim of the current study is to determinate the relationship between methotrexate triglutamate concentrations and the clinical evolution in rheumatoid arthritis patients, as well as to characterize the variability in both features to propose strategies for low-dose methotrexate optimization. The quantification of methotrexate triglutamate concentration in red blood cells was performed through ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Polymorphisms of genes involved in the formation of polyglutamates were determined by real time polymerase chain reaction. A multivariate regression was performed to determine the covariates involved in the variability of methotrexate triglutamate concentrations and a population pharmacokinetics was developed through nonlinear mixed effects modelling. Disease activity score changed according to methotrexate triglutamate concentrations; patients with good response to treatment had higher concentrations than moderate or non-responder patients. The methotrexate triglutamate concentrations were related to time under

	<p>treatment, dose, red blood cells and body mass index. One-compartment open model was selected to estimate the pharmacokinetic parameters; the typical total clearance (L/day) was determined as <math>1.45 \cdot (\text{body mass index} / 28 \text{ Kg/m}^2) \cdot (\text{red blood cells} / 4.6 \times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{L})</math>, the volume of distribution was 52.4 L with an absorption rate of 0.0346 day<sup>-1</sup> and a fraction metabolized of 1.03%. Through the application of the model, the initial dose of methotrexate is proposed based on stochastic simulations and considering methotrexate triglutamate concentrations found in responders patients.</p>

SCHOLARONE™  
Manuscripts

**ANEXO 2: “*Disease activity and therapeutic drug monitoring of low-dose methotrexate administered daily or weekly in patients with rheumatoid arthritis.*”**

# PHARMACOTHERAPY

## Disease activity and therapeutic drug monitoring of low-dose methotrexate administered daily or weekly in patients with rheumatoid arthritis.

Journal:	<i>Pharmacotherapy</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rodríguez-Báez, Ana; Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas Huerta-García, Ana; Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas Medellín-Garibay, Susanna; Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas Rodríguez-Pinal, Cristian; Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas Martínez-Martínez, Marco; Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto, Departamento de Reumatología Herrera-Van Oostdam, David; Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto, Departamento de Reumatología Abud-Mendoza, Carlos; Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto, Departamento de Reumatología Romano-Moreno, Silvia; Universidad Autónoma de San Luis Potosí Milán-Segovia, Rosa del Carmen; Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Keywords:	Polyglutamates of methotrexate, Disease activity score, Low dose methotrexate, Rheumatoid arthritis
Abstract:	Background: Low-dose of methotrexate is usually given on a weekly dosage scheme to treat rheumatoid arthritis; nevertheless, to reduce the side effects and increase adherence to treatment, some alternatives in the dosage scheme have been proposed. Objective: To explore and compare the safety, clinical effectiveness, and blood MTX polyglutamates concentrations of oral low-dose MTX administered through daily or weekly dosage regimen at 6, 12 and 24 weeks after the beginning of treatment in patients with new diagnosis of rheumatoid arthritis. Methods: Patients newly diagnosed with rheumatoid arthritis were randomized into two groups: A) initial daily dose of 2.5 mg/5 days per week and B) single weekly dose of 12.5 mg of methotrexate. Patients were evaluated and sampled at 6, 12 and 24 weeks after starting methotrexate treatment. The clinical response was evaluated through standardized Disease Activity Score and the presence of adverse events was registered at each medical visit. Polyglutamates of methotrexate were extracted from red blood cells and were quantified by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.



	<p>Results: Initially, 92 patients were included, only 50% completed the study, mainly due to non-adherence problems in 33 and 50% of patients from group A and B; good response was observed in 29 and 25.5% patients, respectively and a global frequency of adverse events of 37% was recorded. Methotrexate triglutamate blood concentrations were higher in normal weight than in obese patients with a median (interquartile range) of 28 (17.95-45.15) and 10.35 (5.22-30.88) nM without differences between dosage groups.</p> <p>Conclusions: Daily dosage regimen represents a therapeutic alternative for patients with rheumatoid arthritis without compromising the efficacy and safety of methotrexate treatment and with similar adherence patterns than weekly dosage regimen; further, methotrexate triglutamate concentrations could be a useful tool for therapeutic drug monitoring purposes.</p>

SCHOLARONE™  
Manuscripts