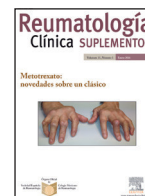




Reumatología clínica

www.reumatologiaclinica.org



Metotrexato: novedades sobre un clásico

Farmacología del metotrexato

Carlos Goicoechea García

Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:
Metotrexato
Farmacocinética
Farmacodinamia

A mediados del siglo xx se sintetiza el metotrexato, un fármaco antagonista del ácido fólico, buscando reducir los efectos secundarios de la aminopterina, otro antitumoral inhibidor del ciclo de crecimiento celular. Indicado inicialmente como fármaco antitumoral por sus efectos antiproliferativos e inmunosupresores, en los últimos años el metotrexato se ha convertido en el tratamiento de elección de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias crónicas. Aunque el mecanismo de acción subyacente a este efecto antiinflamatorio no está aún bien caracterizado, su eficacia para frenar la evolución de la enfermedad lo ha convertido en un fármaco de primera línea. En este artículo se resumen sus principales características farmacodinámicas y farmacocinéticas, y se dejan los datos relacionados con la eficacia terapéutica para otros capítulos de esta monografía.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Pharmacology of methotrexate

ABSTRACT

Keywords:
Methotrexate
Pharmacokinetics
Pharmacodynamics

Methotrexate, a folic acid antagonist, was synthesised in the mid-twentieth century, with the aim of reducing the adverse effects of aminopterin, another drug inhibiting the growth rate of cancer cells. Methotrexate was initially indicated as an anti-cancer drug due to its antiproliferative and immunosuppressive effects but in the last few years it has become the treatment of choice in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. Although the mechanism of action underlying these anti-inflammatory effects has still not been well-characterized, the effectiveness of methotrexate in halting disease progression has made it a first-line drug. This article summarises its main pharmacodynamics and pharmacokinetic characteristics. Data on its therapeutic effectiveness are described elsewhere in this supplement.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

En la tercera edición del “Flórez” (de 1997), uno de los libros de farmacología humana más utilizado en las facultades de medicina, el metotrexato (MTX) figuraba como un fármaco de aplicación terciaria para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), es decir, formaba parte de un grupo de fármacos que se reservaban como el tercer escalón del abordaje terapéutico (junto con la azatioprina, la ciclofosfamida y la ciclosporina). En la sexta, y última edición, de 2014, el MTX figura como fármaco de primera elección y dice textualmente que es “la piedra angular sobre la que se apoya el tratamiento inicial

de la AR en pacientes no tratados previamente con otro FAME” (FAME: fármaco modificador de la enfermedad)¹. En el mismo sentido se manifiesta la Sociedad Española de Reumatología a través de su *Guía de práctica clínica para el manejo de la artritis reumatoide en España*, publicada en 2007 y actualizada en 2011. Su papel central en el tratamiento de la AR y otras enfermedades justifica la necesidad de conocer en detalle la farmacología de este compuesto.

Síntesis y mecanismo de acción

A mediados del siglo pasado, la aminopterina, un antimetabolito del ácido fólico, se empezó a emplear como fármaco antitumoral por sus efectos antiproliferativos. De forma casi simultánea se usó por primera vez para el tratamiento de la AR en 1951². Sin embargo, la elevada presencia de efectos secundarios estimuló la búsqueda de nuevos fármacos similares con menor incidencia de efectos adversos.

Correo electrónico: carlos.goicoechea@urjc.es

Su síntesis partió de un proceso de diseño racional: se sabía que el ácido fólico es necesario para la síntesis de las purinas y pirimidinas necesarias para la proliferación celular y se buscaba un compuesto capaz de bloquear el efecto del ácido fólico. Su estructura química es muy similar a la del MTX (fig. 1), salvo en 2 puntos: el grupo 4 hidroxilo del anillo pteridínico del ácido fólico se reemplaza por un grupo amino y el nitrógeno de la posición 10 está metilado en el MTX³. Estas modificaciones permiten que el MTX muestre mayor afinidad por la dihidrofolato reductasa que el propio ácido fólico.

Así, el mecanismo de acción por el cual el MTX actúa como fármaco antitumoral se comprende bien (fig. 2): la dihidrofolato reductasa es la enzima que transforma el ácido dihidrofolático en tetrahidrofolático. El MTX, al mostrar mayor apetencia por la enzima bloquea de forma reversible su actividad, reduciendo así la síntesis de tetrahidrofolático. Además, el MTX intracelular, en forma de poliglutamatos, impide la síntesis de purinas al bloquear la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (ATIC), la enzima terminal de esa ruta metabólica⁴. Igualmente inhibe la síntesis de pirimidinas al bloquear la timidilato sintetasa⁵.

Este mecanismo, que actúa eficazmente bloqueando el ciclo de división celular, no parece, sin embargo, estar directamente implicado en su acción como fármaco antiartrítico.

La justificación para su uso en la artritis no era muy sólida inicialmente. En la década de los cincuenta del siglo pasado se empleaban regularmente los corticoides, pero ya se era consciente de los efectos secundarios asociados a su uso. Dado que la aminopterina tenía efectos antiproliferativos, al igual que los corticoides (aunque ahora se sabe que por mecanismos diferentes), esta se empleó eficazmente, como ya se ha comentado, para el tratamiento de la AR. La incidencia de efectos secundarios desaconsejó su uso, pero estos primeros estudios abrieron la puerta a ensayar el MTX, primero en psoriasis⁶ y más tarde en la propia artritis⁷.

Son varias las hipótesis que podrían explicar la causa de la eficacia del MTX en el tratamiento de la AR, sin que por el momento la evidencia científica permita de forma inequívoca decantarse por una de ellas:

- Aunque estudios *in vitro*⁸ demostraron que, en determinados tejidos celulares, la administración de MTX favorecía la producción de especies reactivas de oxígeno, esta observación no se ha podido confirmar en todo tipo de células, particularmente monocitos o macrófagos. Otros autores abogan por un efecto inhibitorio (dependiente de adenosina) del MTX sobre la activación de las células T y la expresión de moléculas de adhesión (este último independiente de adenosina)⁹.
- Es sabido que el MTX disminuye la producción de citocinas proinflamatorias, como la interleucina (IL) 12A y otras y el interferón

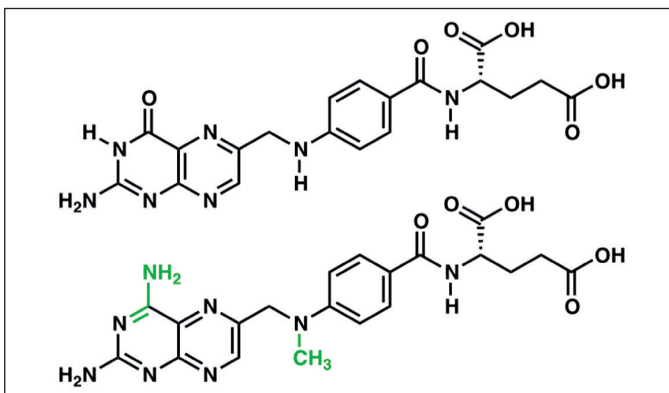


Figura 1. Estructuras químicas del ácido fólico (arriba) y del metotrexato (abajo) donde se resaltan los 2 cambios estructurales mencionados en el texto.

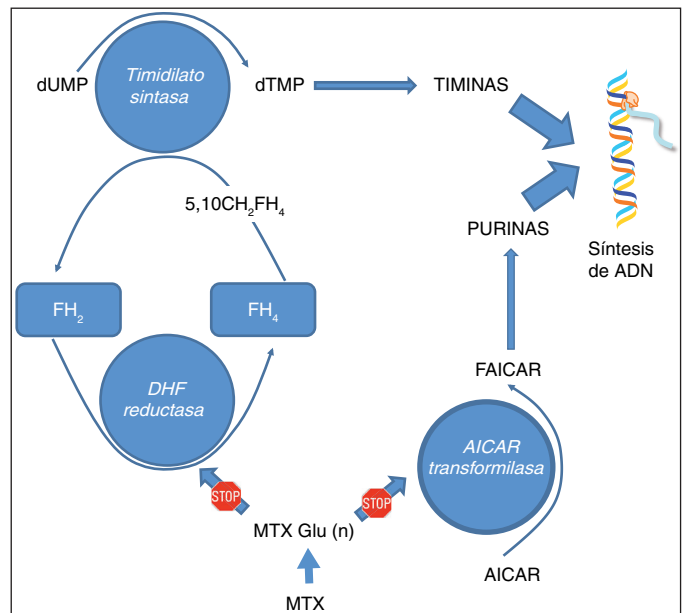


Figura 2. Mecanismo antitumoral del metotrexato (MTX). El MTX bloquea la síntesis de las proteínas necesarias para la síntesis de material genético y la duplicación celular actuando como falso sustrato (antimetabolito) de la DHF reductasa y la AICAR transformilasa. 5,10CH₂FH₄: 5,10-metil-tetrahidrofolato; AICAR: icoadenosin-imidazol-carboxamida-ribonucleótido; CAR: formaimido-imidazol-carboxamida-ribonucleótido; dTMP: desoxitimidina monofosfato; FAI: desoxiuridina monofosfato; FH₂: dihidrofolato; MTX Glu(n): metotrexato poliglutamato; FH₄: tetrahidrofolato.

INF- γ , y aumenta la expresión de genes codificadores de proteínas antiinflamatorias, como IL-4 e IL-10¹⁰. También se ha descrito que su acción antiinflamatoria podría estar relacionada con su capacidad para inhibir el factor nuclear kappa B (NF- κ B), un agente fundamental en el proceso inflamatorio; es interesante, además, señalar que esta interacción se bloquea por la administración de antagonistas de adenosina¹¹.

- Sin embargo, existen igualmente reportes que indican que el MTX podría potenciar la producción de IL proinflamatorias (IL-1, IL-6), que los autores asocian con algunos de sus efectos secundarios¹².
- Una de las hipótesis con más evidencia es la que relaciona el efecto antiinflamatorio del MTX con la adenosina. Por ejemplo, en un modelo animal de inflamación por administración de carragenina, el efecto antiinflamatorio de MTX se bloquea tanto por la administración de un antagonista del receptor A2a de adenosina como por la administración de una enzima catabolizadora de la adenosina¹³. Igualmente hay datos en tejido humano que confirman esta relación¹⁴. Es muy probable que al menos parte de esta interacción con la adenosina esté relacionada con el efecto intracelular del MTX. Como se ha comentado, el MTX en forma de poliglutamatos interacciona con diversas enzimas citoplasmáticas (AICAR, ATIC o TYMS) y además incrementa la síntesis de adenosina. En la figura 3 se esquematiza una posible explicación del mecanismo de acción antiinflamatorio del MTX, basado en los trabajos de Montesinos et al¹⁵ y Sauer et al¹⁶. De acuerdo a sus propuestas, la presencia intracelular de MTX poliglutamato en el lugar de la inflamación bloquearía la formación de FAICAR, al inhibir la acción de la AICAR transformilasa. Esto supondría un incremento de AICAR, lo que, por inhibición competitiva de la adenosina monofosfato (AMP) desaminasa, provoca un acúmulo de AMPc. La célula expulsa el exceso de AMPc fuera de ella, donde se transformaría en adenosina. Como tal se uniría al receptor A2a del linfocito (ADORA2A), lo que favorece la síntesis de pKA. Esta enzima bloquearía la formación de NF- κ B y con ello la síntesis de citocinas inflamatorias.

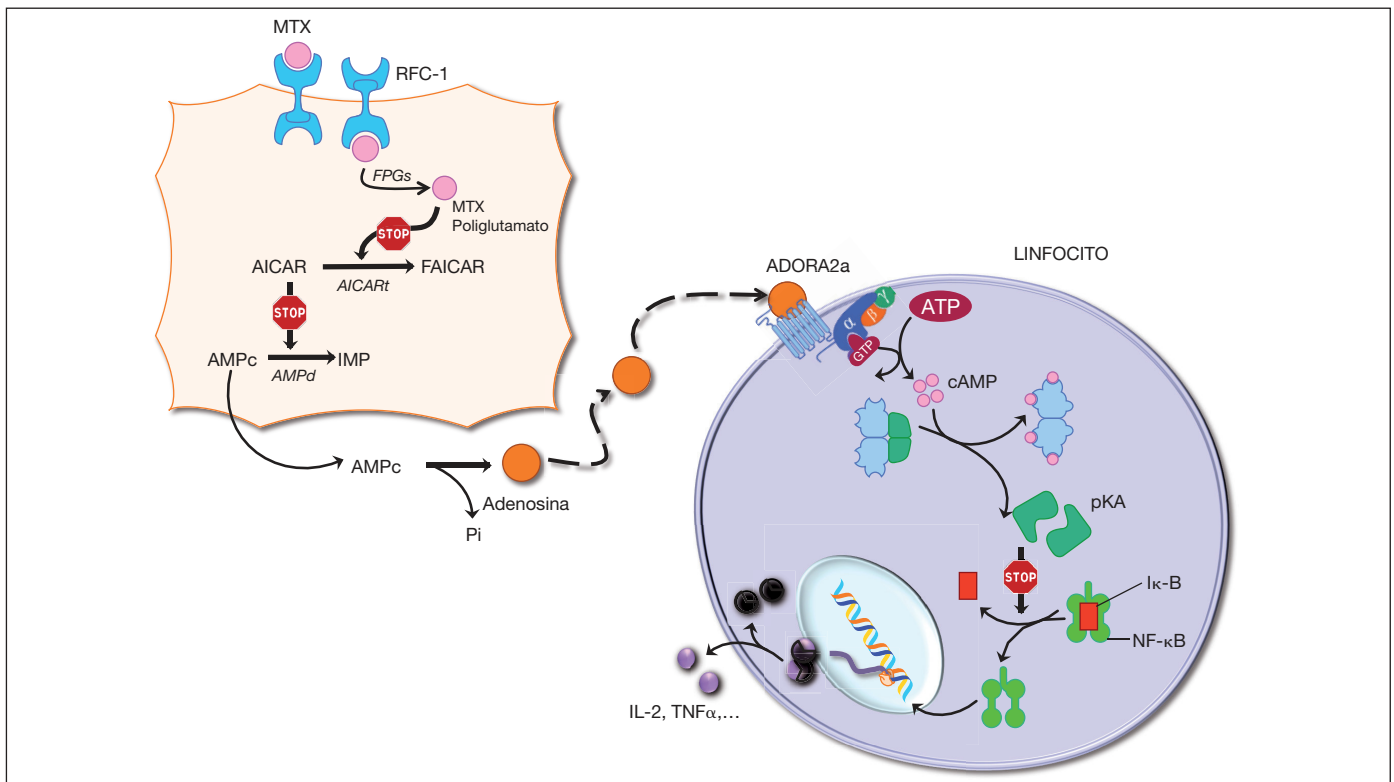


Figura 3. Propuesta de mecanismo de acción antiinflamatorio del metotrexato. El metotrexato provoca la liberación de AMPc al exterior celular, donde se transforma en adenosina, que se une a los linfocitos para impedir la síntesis de sustancias proinflamatorias. Ver texto para una explicación más detallada. A partir de Montesinos et al, 2007¹⁵ y Sauer et al, 2012¹⁶. ADORA2a: receptor de adenosina 2a; AICAR: icoadenosín-imidazol-carboxamida-ribonucleótido; AICARt: aicoadenosín-imidazol-carboxamida-ribonucleótido transferilasa; AMPd: adenosina monofosfato desaminasa; FAICAR: formilicoadenosín-imidazol-carboxamida-ribonucleótido; FPGs: folilpoliglutamato sintasa; RFC-1: *reduced folate carrier 1*.

- Muy recientemente se ha relacionado el efecto del MTX con la vía metabólica JAK/STAT. Esta vía intracelular está implicada directamente en la transducción de información generada por diversas citocinas y controla respuestas inmunitarias e inflamatorias. La administración de dosis bajas de MTX bloquea la vía JAK/STAT impidiendo su respuesta inflamatoria, de forma independiente de la enzima dihidrofolato reductasa¹⁷.

Farmacocinética

Absorción

El MTX se encuentra disponible en formas enterales y parenterales: en formas parenterales, la vía subcutánea, intramuscular e intravenosa. La administración parenteral será objeto de otro apartado en este monográfico, por lo que no se comentará aquí.

Tras la administración oral, MTX se absorbe en el tracto gastrointestinal, fundamentalmente en el yeyuno proximal. El sistema de absorción es por transporte activo, requiere el uso de proteínas transportadoras y es, por lo tanto, saturable: el aumento de la dosis disminuye la velocidad y la cantidad de absorción. Ello afecta a la biodisponibilidad por vía oral (esto es, la cantidad de fármaco que llega inalterado a la circulación sistémica tras emplear esta vía de administración), que es muy variable, con cifras que van desde el 30 al 90%¹⁸⁻²⁰ dependiendo de la dosis administrada. Esta variación en la biodisponibilidad está también relacionada con las diferencias en el primer paso hepático (esto es, el metabolismo que sufren los fármacos administrados por vía enteral antes de llegar a la circulación sistémica): aunque, de media, el 10% del MTX se transforma en 7-OH-MTX en este primer paso por el hígado^{18,20,21}, este dato varía desde un 0,945 hasta un 13,2%²². Estas diferencias (que afectan no solo al efec-

to de primer paso hepático, sino al metabolismo del fármaco en su conjunto) están relacionadas con diferencias interindividuales en la actividad de las enzimas aldehídoxidas y xantinaoxidas, ambas implicadas en la transformación de MTX a 7-OH-MTX^{22,23}. Las concentraciones plasmáticas máximas, por esta vía, se alcanzan en 1-2 h^{21,24,25}.

Distribución

Aproximadamente, el 50% de MTX está unido a proteínas plasmáticas. La unión a proteínas plasmáticas va a determinar su distribución por el organismo del paciente. Cabe recordar que existe un equilibrio entre la fracción de fármaco libre y la unida a proteínas plasmáticas, y es la fracción libre la que determina el efecto farmacológico. Por ello es muy importante recordar que en pacientes que reciben más de 1 fármaco, estos compiten por la unión a estas proteínas y el fármaco que es desplazado va a ver aumentado su efecto farmacológico, al aumentar su fracción plasmática libre. Este tipo de interacción farmacocinética se debe tener en cuenta cuando el paciente recibe de forma concomitante MTX y alguno de los siguientes grupos farmacológicos: salicilatos, fenilbutazona, fenitoína, barbitúricos, tranquilizantes, anticonceptivos orales, tetraciclinas, derivados de la amidopirina o sulfonamidas. Todos estos muestran mayor afinidad por la albúmina sérica que el MTX, lo que supone un desplazamiento del MTX, con lo que aumenta su fracción libre y con ello el efecto farmacológico. Sin embargo, pese a una posible interacción a este nivel, en la práctica clínica no parece tener especial relevancia²⁶.

El volumen de distribución del MTX (que relaciona la dosis administrada con la concentración plasmática del fármaco y, con ello, da una idea de la distribución del fármaco en el organismo del paciente) varía entre 0,7 y 1,4 l/kg, lo que confirma que alcanza el comparti-

miento intracelular de eritrocitos, leucocitos, hepatocitos y célula sinovial en cantidad suficiente para ejercer su acción.

La entrada del MTX al interior de la célula se debe a la existencia de un sistema de transporte denominado RFC1 (del inglés *reduced folate carrier*, transportador de folato reducido). Se ha descrito la existencia de distintos polimorfismos genéticos que provocan diferencias significativas en el proceso de absorción intracelular del MTX y, por lo tanto, en su respuesta farmacológica²⁷. Estos polimorfismos pueden facilitar la entrada del MTX, con lo que potenciarían el efecto terapéutico, pero, por la misma razón, podrían aumentar la incidencia de efectos adversos. Además se ha comprobado que la existencia de otros polimorfismos, asociados esta vez a las rutas enzimáticas en la síntesis de bases púricas y pirimidínicas, puede igualmente modificar la eficacia del MTX, puesto que algunas de las enzimas implicadas en estas rutas (TIMS, ATIC, etc.) son dianas específicas de este.

La presencia de estos polimorfismos está muy relacionada con la presencia de efectos secundarios, la falta de eficacia del MTX en determinadas poblaciones de pacientes e incluso con el abandono del tratamiento²⁸. Una completa y actualizada revisión del estado de la cuestión en cuanto a polimorfismos, MTX y AR puede encontrarse en otro capítulo de este monográfico y en una reciente revisión en la revista *Pharmacogenomics*²⁹.

Una vez dentro de la célula, el MTX, por acción de la enzima folil-poliglutamato sintetasa, se transforma en MTX-poliglutamato, un compuesto que se acumula en el interior de la célula (solo puede volver a salir de la célula si es hidrolizado a MTX-monoglutamato, por medio de la gammaglutamilhidrolasa). Por ello, después de su distribución por los tejidos corporales, se encuentran concentraciones altas en forma de poliglutamatos, en particular en el hígado, riñones y bazo, que se pueden mantener durante semanas o meses²⁶.

Metabolismo

El MTX se metaboliza en el hígado en un 10% (según ficha técnica) o entre un 5-7% según otros autores^{18,21}, dando como principal metabolito el 7-hidroximetotrexato, una molécula activa que contribuye a prolongar el efecto terapéutico del MTX. Además de este metabolito principal, hasta un 5% de la dosis administrada de MTX se metaboliza en el intestino en ácido 4-amino-desoxi-N10-metilptericoico por acción de la flora intestinal³⁰.

Excreción

La excreción del MTX, en su mayor parte inalterado, se produce fundamentalmente por vía renal mediante filtración glomerular y secreción activa en el túbulo proximal. Aproximadamente el 5-20% de MTX y el 1-5% de 7-hidroximetotrexato se eliminan por vía biliar. Existe un importante flujo sanguíneo enterohepático. En caso de insuficiencia renal, la eliminación se retrasa de forma importante.

Ciertos fármacos que pueden estar siendo utilizados en pacientes con artritis (probenecid, diuréticos del asa, fenilbutazona) pueden reducir la eliminación renal del MTX aumentando el riesgo de toxicidad. Aunque se ha citado el riesgo de toxicidad aumentada por interacción a este nivel con antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o salicilatos, no parece que muestre relevancia clínica.

De hecho, una reciente revisión Cochrane³¹ ha confirmado la ausencia de riesgo en el uso conjunto de AINE y MTX (salvo para el ácido acetilsalicílico).

Reacciones adversas

En general son poco importantes y pueden manejarse sin necesidad de interrumpir el tratamiento. La alopecia, la estomatitis o la intolerancia gastrointestinal pueden prevenirse o reducirse con la administración concomitante de ácido fólico o ácido folínico. Menos frecuentes son la leucopenia, que remite con la retirada del fármaco, y la

mielosupresión. El daño hepático no suele ser frecuente; se han descrito elevaciones ocasionales de las transaminasas hepáticas, que reversion con la interrupción del tratamiento. En todo caso, el empleo conjunto de otro fármaco hepatotóxico debe evaluarse cuidadosamente¹.

La reacción más grave puede ser la neumonitis que, pese a ser poco frecuente, puede provocar una mortalidad en torno al 17%. Por ello se recomienda controlar regularmente parámetros hematológicos y hepáticos, así como la función renal y la pulmonar¹.

Interacciones

Determinados fármacos (la penicilina, los glucopéptidos, las sulfonamidas, el ciprofloxacino y la cefalotina) pueden reducir el aclaramiento renal del MTX, lo que puede provocar un aumento de la toxicidad hematológica y gastrointestinal.

El uso conjunto de MTX con otros FAME es, en general, seguro. Hay estudios que notifican un aumento del riesgo hepático en MTX asociado a leflunomida³²; sin embargo, recientemente³³, el estudio SMI-LE descartó la existencia de un aumento del riesgo por asociación de leflunomida y MTX.

El uso de MTX y otros inmunosupresores está igualmente sujeto a discusión. Así, mientras algunos autores indican el aumento del riesgo renal al asociar ciclosporina con MTX³⁴, otros autores no reportaron un aumento de dicho riesgo³⁵.

El aumento de toxicidad cuando el MTX se asocia a agentes biológicos está relacionado fundamentalmente con interacciones farmacodinámicas (relacionadas con el mecanismo de acción) más que con causas farmacocinéticas. Efectivamente, el uso concomitante de fármacos anti-TNF α y MTX aumenta el riesgo de infecciones por inmunosupresión³⁶, pero la farmacocinética de etanercept no parece verse modificada por MTX³⁷. Resultados similares (ausencia de interacciones farmacocinéticas) se han descrito para otros biológicos como rituximab³⁸. Tampoco se han hallado cambios en los valores de hemoglobina A1C ni de glucosa entre un tratamiento con inhibidores de TNF más MTX frente a MTX solo³⁹.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Fera M. Fármacos analgésicos antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, editores. Farmacología Humana. 6.ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 348-74.
2. Gubner R, August S, Ginsberg V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am J Med Sci.* 1951; 221:176-82.
3. Kerr S. Drug discovery through enzyme inhibition. En: Lemke TL, Williams DA, editores. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 283-306.
4. Goodman S. Measuring methotrexate polyglutamates. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28 Suppl 61:S24-6.
5. Cronstein B. Low dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.* 2005;57:163-72.
6. Edmundson WF, Guy WB. Treatment of psoriasis with folic acid antagonists. *Arch Dermatol.* 1958;78:200-3.
7. Kahn MF, Besideau M, De Seze S. Immunosuppressive drugs in the management of malignant and severe rheumatoid arthritis. *Proc Roy Soc Med.* 1967;60:130-3.
8. Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol.* 2003;138:501-11.
9. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol.* 2005;114:154-63.
10. Hohl EL, Mader RM, Erlacher L, Duhm B, Mustak M, Bröll H, et al. The influence of methotrexate on the gene expression of the pro-inflammatory cytokine IL-12A in the therapy of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29:963-9.
11. Spurlock CF 3rd, Gass HM 4th, Bryant CJ, Wells BC, Olsen NJ, Aune TM. Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor κ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54:178-87.

12. Olsen NJ, Spurlock CF 3rd, Aune TM. Methotrexate induces production of IL-1 and IL-6 in the monocytic cell line U937. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R17.
13. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest.* 1993;92:2675-82.
14. Riksen NP, Barrera P, Van den Broek PH, Van Riel PL, Smits P, Rongen GA. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:465-70.
15. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernández P, Cronstein BN. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1440-5.
16. Sauer AV, Brigida I, Carriglio N, Aiuti A. Autoimmune dysregulation and purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Front Immunol.* 2012;3:265.
17. Thomas S, Fisher KH, Snowden JA, Danson SJ, Brown S, Zeidler MP. Methotrexate is a JAK/STAT pathway inhibitor. *PLoS One.* 2015;10:e0130078.
18. Bannwarth B, Pehourcq F, Schaeverbeke T, Dehais J. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacokin.* 1996;30:194-210.
19. Godfrey C, Sweeney K, Miller K, Hamilton R, Kremer J. The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 1998;46:369-76.
20. Seideman P, Beck O, Eksborg S, Wennberg M. The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 1993;35:409-12.
21. Chládek J, Martínková J, Simková M, Vanecková J, Koudelková V, Nozicková M. Pharmacokinetics of low doses of methotrexate in patients with psoriasis over the early period of treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;53:437-44.
22. Baggott JE, Morgan SL. Methotrexate catabolism to 7-hydroxymethotrexate in rheumatoid arthritis alters drug efficacy and retention and is reduced by folic acid supplementation. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2257-61.
23. Chládek J, Martínková J, Sispera L. An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver. *Physiol Res.* 1997;46:371-9.
24. Herman RA, Veng-Pedersen P, Hoffman J, Koehnke R, Furst DE. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J Pharm Sci.* 1989;78:165-71.
25. Oguey D, Kölliker F, Gerber NJ, Reichen J. Effect of food on the bioavailability of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992;35:611-4.
26. Fiehn C. Methotrexate transport mechanisms: the basis for targeted drug delivery and β -folate-receptor-specific treatment. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28 Suppl 61:S40-5.
27. Ranganathan P, McLeod HL. Methotrexate pharmacogenetics: The first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1366-77.
28. Uribarri M, Ruiz-Larrañaga O, Arteta D, Hernández L, Alcaro MC, Martínez A, et al. Influence of MTHFR C677T polymorphism on methotrexate monotherapy discontinuation in rheumatoid arthritis patients: results from the GAPAD European project. *Clin Exp Rheumatol.* 2015;33:699-705.
29. Zhu H, Deng FY, Mo XB, Qiu YH, Lei SF. Pharmacogenetics and pharmacogenomics for rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate treatment: the 2013 update. *Pharmacogenomics.* 2014;15:551-66.
30. Mack DR, Young R, Kaufman SS, Ramey L, Vanderhoof JA. Methotrexate in patients with Crohn's disease after 6-mercaptopurine. *J Pediatr.* 1998;132:830-5.
31. Colebatch AN, Marks JL, Van der Heijde DM, Edwards CJ. Safety of nonsteroidal antiinflammatory drugs and/or paracetamol in people receiving methotrexate for inflammatory arthritis: a Cochrane systematic review. *J Rheumatol Suppl.* 2012;90:62-73.
32. Lee SW, Park HJ, Kim BK, Han KH, Lee SK, Kim SU, et al. Leflunomide increases the risk of silent liver fibrosis in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *Arthritis Research Therapy.* 2012;14:R232.
33. Bird P, Griffiths H, Tymms K, Nicholls D, Roberts L, Arnold M, et al. The SMILE study - safety of methotrexate in combination with leflunomide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2013;40:228-35.
34. Gerards AH, Landewé RB, Prins AP, Bruyn GA, Goei Thé HS, Laan RF, et al. Cyclosporin A monotherapy versus cyclosporin A and methotrexate combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: a double blind randomised placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:291-6.
35. Sarzi-Puttini P, D'Ingianna E, Fumagalli M, Scarpellini M, Fiorini T, Chérié-Lignière EL, et al. An open, randomized comparison study of cyclosporine A, cyclosporine A + methotrexate and cyclosporine A + hydroxychloroquine in the treatment of early severe rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2005;25:15-22.
36. Callen JP. Complications and adverse reactions in the use of newer biologic agents. *Semin Cutan Med Surg.* 2007;26:6-14.
37. Zhou H, Mayer PR, Wajdula J, Fatenejad S. Unaltered etanercept pharmacokinetics with concurrent methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol.* 2004;44:1235-43.
38. Davies B, Shaw T. Rituximab pharmacokinetic characteristics are not influenced by combination with methotrexate or cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:FR10128.
39. Wu JJ, Rowan CG, Bechuk JD, Anthony MS. No association between TNF inhibitor and methotrexate therapy versus methotrexate in changes in hemoglobin A1C and fasting glucose among psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis patients. *J Drugs Dermatol.* 2015;14:159-66.