



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Polimorfismo do gene timidilato sintase e nível plasmático total de homocisteína em um grupo de pacientes turcos com artrite reumatoide: relação com a atividade da doença e toxicidade ao metotrexato



Pınar Borman^{a,*}, Özgür Taşbaş^a, Halil Karabulut^b, Ajlan Tukun^b e Rezan Yorgancıoğlu^a

^a Ankara Training and Research Hospital Clinic of Physical Medicine and Rehabilitation, Ankara, Turquia

^b Departamento de Genética, Faculdade de Medicina, Ankara University, Ankara, Turquia

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 19 de maio de 2014

Aceito em 1 de dezembro de 2014

On-line em 28 de janeiro de 2015

Palavras-chave:

Artrite reumatoide

Timidilato sintase

Homocisteína

Polimorfismo

Metotrexato

R E S U M O

Introdução: Relata-se que o polimorfismo do gene timidilato sintase (TS) e a homocisteína têm relação com o metabolismo do metotrexato (MTX), com achados conflitantes. O objetivo deste estudo foi determinar os níveis de homocisteína e a frequência de polimorfismos de repetição tripla (TS3R) e dupla (TS2R) do gene TS em um grupo de pacientes turcos com AR e avaliar sua associação com a toxicidade ao MTX e a atividade da doença.

Métodos: Foram incluídos no estudo 64 pacientes com AR e 31 indivíduos no grupo controle, com média de $48,7 \pm 12,5$ e $46,2 \pm 13,4$ anos. Foram obtidas as características demográficas e foi registrado o número de pacientes que relataram efeitos adversos ao MTX no grupo AR. Foram analisados os níveis de homocisteína e os polimorfismos TS2R/TS3R. Foi determinada a distribuição de genótipos de acordo com a toxicidade ao MTX e a atividade da doença.

Resultados: Os dados demográficos foram semelhantes entre os pacientes e controles. Todos faziam suplementação de ácido fólico a uma dose média de 5 mg/semana. Dos 64 pacientes, 36 apresentaram efeitos adversos ao tratamento com MTX. Encontrou-se uma frequência de polimorfismos TS2R e TS3R semelhante nos grupos AR e controle. Encontrou-se que os polimorfismos TS2R e TS3R eram semelhantes em pacientes com e sem eventos adversos relacionados com o MTX. O nível médio de homocisteína também foi similar em pacientes com e sem polimorfismo do gene TS, mas era mais elevado ($12,45 \mu\text{mol/L}$ vs. $10,7 \mu\text{mol/L}$) em pacientes com do que sem efeitos adversos relacionados com o MTX. O nível médio de homocisteína se correlacionou com o VHS no grupo AR.

* Autor para correspondência.

E-mail: pınarborman@gmail.com (P. Borman).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.12.001>

0482-5004/© 2015 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Conclusões: Os níveis de homocisteína podem afetar a atividade da doença e a toxicidade ao MTX, mas os polimorfismos 2R e 3R no gene TS não se correlacionaram com a toxicidade ao MTX em pacientes com AR que recebem suplementação de ácido fólico. São necessários mais estudos para esclarecer os polimorfismos em outras enzimas que podem ser responsáveis pela toxicidade ao MTX em pacientes com AR.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Thymidylate synthase genetic polymorphism and plasma total homocysteine level in a group of Turkish patients with rheumatoid arthritis: relationship with disease activity and methotrexate toxicity

A B S T R A C T

Keywords:

Rheumatoid arthritis
Thymidylate synthase
Homocysteine
Polymorphism
Methotrexate

Background: The polymorphism of thymidylate synthase (TS) gene and homocysteine are reported to have a relationship to methotrexate (MTX) metabolism, with conflicting results. The aim of this study was to determine homocysteine levels and the frequency of TS gene triple repeat (TS3R) and double repeat (TS2R) polymorphisms in a group of Turkish RA patients and evaluate its association with MTX toxicity and disease activity.

Methods: Sixty-four patients with RA and 31 control subjects with a mean age of 48.7 ± 12.5 and 46.2 ± 13.4 years, were enrolled to the study. Demographic characteristics were obtained and number of patients with MTX-related adverse affects, were recorded in the patient group. The homocysteine levels and TS2R/TS3R polymorphisms of the TS gene were analyzed and the distribution of genotypes according to MTX toxicity and disease activity, were determined.

Results: The demographic properties were similar between the patient and control subjects. Folic acid supplementation with a mean dose of 5 mg folic acid/week, was present in all patients. Thirty-six of the 64 patients showed adverse effects to MTX treatment. The frequency of TS2R and TS3R polymorphisms were found to be similar in the patient and control groups. TS2R and TS3R gene polymorphisms were found to be similar in patients with and without MTX-related adverse events. The mean homocysteine level was also similar in patients with and without TS gene polymorphism, but was found to be higher ($12.45 \mu\text{mol/L}$ vs $10.7 \mu\text{mol/L}$) in patients with MTX-related side effects than in patients without side effects. The mean level of homocysteine was correlated with levels of ESR in the patient group.

Conclusions: In conclusion, homocysteine levels might effect the disease activity and toxicity of MTX but 2R and 3R polymorphisms in the TS gene, were not related with MTX-related toxicity in RA patients receiving folate supplementation. Further studies are needed to illuminate the polymorphisms in other enzymes that might be responsible from the MTX toxicity in patients suffering from RA.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

O metotrexato (MTX) é a pedra angular e o fármaco antirreumático modificador da doença mais comumente usado (DMARD) para o tratamento da artrite reumatoide (AR). Os efeitos benéficos do MTX na AR resultam essencialmente de dois aspectos do mecanismo de ação. Ele inibe diretamente várias enzimas dependentes do folato, como a di-hidrofolato-redutase e a timidilato sintase (TS), e leva respectivamente à interrupção na síntese de purina e pirimidina e liberação extracelular de adenosina, um agente anti-inflamatório potente.^{1,2} Vários estudos demonstraram o efeito do polimorfismo genético na eficácia e segurança do MTX, mas as evidências disponíveis ainda não são conclusivas.¹⁻¹³ A TS é um alvo importante do metotrexato. A superexpressão da TS está ligada à resistência a fármacos que tem a TS como alvo.¹⁴

Relata-se que o polimorfismo do gene TS está relacionado com o metabolismo do MTX, com achados conflitantes.³⁻¹³ A homocisteína é um aminoácido que contém o grupo tiol e é um produto intermediário do metabolismo da metionina. Alguns estudos prévios concluíram que a homocisteína plasmática pode ser importante na mediação dos efeitos adversos do MTX.¹⁵⁻¹⁷ Cada vez mais estudos de farmacogenética mostram que diversos polimorfismos de genes, incluindo a variante TS-5' UTR 3R/2R, resultam em hiper-homocisteinemia, que poderia ser responsável pelos efeitos adversos mais comuns e graves relacionados com o MTX.^{7,17,18} Além disso, a hiper-homocisteinemia tem sido associada à inflamação na AR. Também se sabe que os níveis de homocisteína são influenciados por nutrientes, como o ácido fólico e vitaminas do complexo B, e fármacos antirreumáticos, como o MTX.^{6,7,16}

Os objetivos deste estudo foram determinar a frequência de polimorfismos de repetição dupla/tripla (2R/3R) do gene TS e

os níveis de homocisteína em um grupo de pacientes com AR e avaliar a sua relação com a atividade da doença e a toxicidade ao MTX.

Métodos

Entre fevereiro e julho de 2009, foram recrutados 64 pacientes que atenderam aos critérios de AR revisados do ACR¹⁹ no ambulatório de reumatologia da Clínica de Medicina Física e Reabilitação do Hospital de Formação e Pesquisa de Ankara

O tratamento atual ou pregresso com MTX foi o principal critério para a inclusão no estudo de pacientes com AR. Pacientes com um IMC médio > 35, com < 18 anos e > 80 anos, com depleção de vitamina B12 e ácido fólico e com doenças comórbidas específicas (insuficiência renal crônica, insuficiência hepática, doenças da tireoide, insuficiência cardíaca e *diabetes mellitus* não controlada) não foram incluídos. Avaliou-se a elegibilidade de 104 pacientes com artrite reumatoide. Foram submetidos a tratamento atual ou pregresso com MTX 98 pacientes, cinco se recusaram a participar e 29 foram excluídos em decorrência da idade ou de doenças concomitantes. Portanto, foram incluídos 64 pacientes com AR. Incluiu-se também um grupo controle com 31 indivíduos saudáveis, com idade e gênero semelhantes (± 2 anos), que eram membros da equipe do hospital e se ofereceram como voluntários. Obteve-se o consentimento informado de todos os pacientes e controles. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do hospital.

Foram registradas as características demográficas de todos os indivíduos, incluindo a idade, o sexo e o índice de massa corporal. Coletou-se também a duração da doença e os fármacos usados nos pacientes com AR. Todos foram submetidos a uma anamnese detalhada e exame físico. A quantidade de pacientes com eventos adversos relacionados com o MTX foi determinada a partir dos arquivos e da anamnese do paciente.

Medidas clínicas

Coletou-se dos prontuários dos pacientes o número de articulações doloridas e inchadas, bem como a duração da doença e o tratamento. Calculou-se o DAS 28 de cada paciente, com o uso de parâmetros conhecidos que incluíam o número de articulações doloridas e inchadas, a velocidade de hemossedimentação (VHS) e a avaliação global da saúde geral dos pacientes expressa com a escala analógica visual.²⁰ A pontuação do Health Assessment Questionnaire (HAQ), que indica o estado funcional dos pacientes com AR, foi registrada a partir dos arquivos.^{21,22} Os valores de VHS, proteína-C reativa (PCR), escore de atividade da doença (DAS) 28 e HAQ foram considerados como parâmetros de atividade da doença.

Exames laboratoriais

Coletaram-se amostras de sangue para determinar a hemoglobina (Hb), VHS com o método Westergren, fator reumatoide (FR) com o método de nefelometria e PCR por turbidimetria no grupo RA. As amostras de sangue foram centrifugadas e as amostras de plasma foram congeladas a -20° C até a análise da homocisteína. Determinou-se a homocisteína plasmática por

imunoensaio ligado a enzima de acordo com as instruções do fabricante (Axis Biochemicals, ASA Norway). Compararam-se os níveis de homocisteína entre os grupos AR e controle. Também foi analisada a correlação entre o nível de homocisteína e as características da doença e os efeitos adversos.

Estudos genômicos

O DNA genômico foi preparado a partir do sangue periférico de pacientes com AR e controles. Os polimorfismos 2 R e 3 R do gene TS foram analisados por amplificação por reação em cadeia da polimerase conforme descrito anteriormente, com pequenas modificações.²³ O programa de amplificação por PCR consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 95° C durante 15 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94° C durante um minuto, modificação hidrotérmica por anelamento (*annealing*) a 64° C durante um minuto, extensão a 72° C durante um minuto e extensão final a 72° C durante 10 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% (Page) durante três horas a 300 V e visualizados por brometo de etídio. Foram comparadas as frequências alélicas e as distribuições dos genótipos entre os grupos AR e controle. Também foi analisada a distribuição de genótipos de acordo com as características da doença e os efeitos adversos.

Análise estatística

Foi feita estatística descritiva, indicada como a média $\pm$ desvio padrão e mediana (máximo e mínimo) para variáveis contínuas. Todos os dados qualitativos são expressos como frequências e percentuais. A normalidade da distribuição das variáveis contínuas foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças na distribuição dos genótipos foram testadas com o teste de qui-quadrado bicaudal. As comparações das variáveis contínuas entre os dois grupos (com e sem polimorfismo) foram feitas pelo testes t de Student e de Mann-Whitney. O teste de correlação de Spearman foi usado para avaliar a correlação entre as variáveis contínuas. O teste qui-quadrado de Pearson ou o teste qui-quadrado exato de Fisher foram usados para definir as variáveis categóricas. O nível de significância considerado foi de 0,05. Todas as análises estatísticas foram feitas com o programa SPSS para Windows, versão 11.5.

Resultados

Foram incluídos no estudo 64 pacientes com AR e 31 indivíduos no grupo controle. Os dados demográficos dos pacientes com AR e controles são apresentados na [tabela 1](#). Não houve diferença estatisticamente significativa entre média de idade, sexo e IMC entre os grupos AR e controle ($p > 0,05$). A maior parte dos pacientes estava em uso de MTX no momento do recrutamento, mas alguns tinham descontinuado o tratamento em razão dos efeitos adversos. A suplementação de ácido fólico com a dose média de 5 mg/semana foi registrada em todos os pacientes.

Trinta e quatro (53%) pacientes faziam uso de MTX e outros DMARD; 38 (59,4%) faziam uso de MTX oral, enquanto

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas dos grupos AR e controle

	AR (n = 64)	Controle (n = 31)
Idade (média ± DP) (anos)	48,7 ± 12,5	46,2 ± 13,4
Sexo (feminino/masculino)	53/11	26/05
IMC (kg/m ²)	27 ± 5	27,5 ± 4,7
Duração da doença (anos)	6,5 (0,50-34)	
Duração do tratamento com MTX (anos)	2 (0,2-10)	
Tratamento concomitante com DMARD (n) (%)	34 (53,1%)	
Fator reumatoide positivo (n) (%)	41 (64,1%)	
Homocisteína (μmol/L) (mediana)	11,2 (5-146)	10,1 (6-18)

IMC, índice de massa corporal; MTX, metotrexato; DMARD, fármaco modificador da doença.

26 (40,6%) estavam em tratamento com MTX subcutâneo. A duração média e a dose de MTX foram de dois anos (0,2-10) e 15 mg/semana (10-20), respectivamente.

Trinta e seis (56,2%) pacientes tinham experimentado efeitos adversos ao tratamento com MTX, dos quais a toxicidade gastrointestinal foi o mais comum. O MTX foi interrompido por 12 (18,8%) pacientes em decorrência dos efeitos adversos. Não houve diferença significativa na dose de MTX e nas características demográficas e clínicas entre os pacientes com e sem efeitos adversos durante o tratamento com MTX ($p > 0,05$).

As frequências de polimorfismos TS2R/TS3R foram determinadas em todos os indivíduos e foram estatisticamente semelhantes entre os grupos AR e controle (tabela 2). Foi feita a distribuição de alelos de polimorfismos em relação a eventos adversos relacionados com o MTX. Encontrou-se que os polimorfismos do gene TS2R/TS3R são similares em pacientes com e sem eventos adversos relacionados com o MTX (tabela 3). A fim de definir a conexão dos efeitos adversos relacionados com o MTX e os polimorfismos no gene TS, analisaram-se os

Tabela 4 – Distribuição genotípica de acordo com os eventos adversos em pacientes que receberam apenas tratamento com metotrexato

Variáveis	Efeito adverso (-) (n = 13)	Efeito adverso (+) (n = 17)	p
TS 2R2R	3 (23,1%)	7 (41,2%)	0,440
TS 2R3R	5 (38,5%)	7 (41,2%)	
TS 3R3R	5 (38,5%)	3 (17,6%)	
2R3R + 3R3R	10 (76,9%)	10 (58,8%)	
TS, timidilato sintase.			

pacientes que receberam apenas tratamento com MTX. Novamente encontrou-se que a distribuição de polimorfismos TS 2R e 3R em pacientes com e sem efeitos adversos é semelhante ($p > 0,05$) (tabela 4).

Também foi determinada a distribuição dos parâmetros de atividade da doença em relação aos polimorfismos dos alelos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a VHS, os níveis de PCR e os valores de HAQ e DAS 28 em relação aos polimorfismos TS 2R e 3R no grupo AR (tabela 5).

Os níveis plasmáticos médios de homocisteína foram estatisticamente semelhantes entre indivíduos dos grupos AR e controle. No grupo AR, o nível médio de homocisteína se correlacionou com os níveis de VHS ($p < 0,05$, $r = 30$) e encontrou-se que são significativamente maiores em pacientes com do que sem efeitos adversos relacionados com o MTX (tabela 6). Os valores de homocisteína também foram semelhantes em pacientes com e sem polimorfismo do gene TS (tabela 7).

Discussão

Os polimorfismos no gene TS mais estudados foram descritos por Horie et al.²⁴ O gene TS contém uma repetição *em tandem* encontrada na região 5' não traduzida. Foram observados indivíduos com duas repetições *em tandem*, três repetições *em*

Tabela 2 – Distribuição dos genótipos (polimorfismos no gene TS) nos grupos AR e controle

	Controle (n = 31) n (%)	AR (n = 64) n (%)	p	OR (IC %)
TS 2R2R	6 (19,4%)	14 (21,9%)	-	1,000 ^a
TS 2R3R	20 (64,5%)	33 (51,6%)	0,539	0,707 (0,234-2,137)
TS 3R3R	5 (16,1%)	17 (26,6%)	0,593	1,457 (0,366-5,801)
2R3R + 3R3R	25 (80,6%)	50 (78,1%)	0,778	0,857 (0,294-2,499)

TS, timidilato sintase; IC, intervalo de confiança.

^a Categoria de referência.

Tabela 3 – Distribuição genotípica de pacientes com AR de acordo com a presença de eventos adversos

	Eventos adversos (-) (n = 28)	Eventos adversos (+) (n = 36)	p	OR (IC 95%)
TS 2R2R	4 (14,3%)	10 (27,8%)	-	1,000 ^a
TS 2R3R	14 (50,0%)	19 (52,8%)	0,375	0,543 (0,141-2,093)
TS 3R3R	10 (35,7%)	7 (19,4%)	0,098	0,280 (0,062-1,266)
2R3R + 3R3R	24 (85,7%)	26 (72,2%)	0,195	0,433 (0,120-1,567)

IC, intervalo de confiança; TS, timidilato sintase.

^a Categoria de referência.

Tabela 5 – Distribuição de parâmetros de atividade da doença de acordo com os polimorfismos no gene timidilato sintase

Variáveis	2R2R (n = 14)	2R3R (n = 33)	3R3R (n = 17)	p
HAQ (mediana)	0,8 (0-3)	0,6 (0-3)	0,75 (0-2,5)	0,695
DAS28 (mediana)	4,0 (2,1-7,5)	4,0 (1,7-7,8)	4,5 (1,9-6,9)	0,909
VHS (mediana)	29,0 (10,0-120,0)	30,0 (2,0-82,0)	25,0 (7,0-65,0)	0,695
PCR (mediana)	0,7 (0,3-10,0)	0,7 (0,1-10,5)	0,8 (0,2-4,8)	0,409

HAQ, Health Assessment Questionnaire; DAS, escore de atividade da doença; VHS, velocidade de hemossedimentação; PCR, proteína C-reativa.

Tabela 6 – Níveis de homocisteína de acordo com a presença de efeitos adversos do metotrexato em pacientes com AR

	Homocisteína	p
Efeitos adversos		0,024
Ausentes	10,7 (5,0-33,0)	
Presentes	12,45 (6,8-146,0)	

Tabela 7 – Níveis de homocisteína de acordo com o polimorfismo do gene timidilato sintase

	Homocisteína	p
TS 2R2R	11,3 (5,2-146,0)	0,893 ^a
TS 2R3R	11,0 (5,2-50,0)	
TS 3R3R	11,0 (5,0-42,0)	
2R3R + 3R3R	11,0 (5,0-50,0)	0,655 ^b

TS, timidilato sintase.

^a Análise de variância entre os genótipos.

^b Comparação entre genótipos com alelo de risco e genótipo de referência.

tandem ou genótipo heterozigótico. Essa região de repetição *em tandem* atua como um *enhancer* para o promotor do TS e leva a um aumento na atividade da TS. A região *enhancer* promotora do gene TS contém um polimorfismo de repetição *em tandem* dupla (2R) ou tripla (3R) de 28 pares de bases (pb) em que o genótipo 3R está associado a uma maior expressão do gene TS.^{24,25}

O presente estudo mostrou que a frequência de polimorfismos TS2R e TS3R foi semelhante em pacientes turcos com AR e controles saudáveis. As taxas de polimorfismo de repetição *em tandem* da região 5' não traduzida foram significativamente menores dos que nos estudos prévios. Isso poderia estar relacionado com diferenças étnicas.²⁶

Estudos prévios relataram que a genotipagem para o polimorfismo TS pode tornar-se um indicador útil para determinar a dosagem apropriada de MTX e para o monitoramento da toxicidade ao MTX em pacientes com AR.^{2,6,9,11} Foram encontrados dados confusos sobre o impacto do polimorfismo TS na resposta ao tratamento com MTX em pacientes com AR, já que a TS é uma das enzimas da via metabólica do folato que é diretamente inibida pelo MTX. Foram relatadas uma atividade da doença mais baixa e uma melhor resposta às baixas doses de MTX em pacientes com polimorfismo TS.² Kumagai et al.⁹ e Inoue et al.¹¹ avaliaram a relação entre a resposta ao MTX e o genótipo TS em pacientes japoneses e encontraram uma melhor resposta ao MTX em pacientes com alelos 6 BP na região 3' não traduzida da TS. Mas os pacientes

analisados em seu estudo estavam em tratamento com baixas doses (6 mg/semana) de MTX. Por outro lado, o genótipo 3R/3R esteve associado a uma resposta fraca ao tratamento com MTX em alguns estudos anteriores.^{6,13} No que diz respeito à toxicidade por MTX, o polimorfismo do gene TS esteve associado à ocorrência de alopecia,¹⁸ enquanto não foi relatada qualquer outra relação entre o polimorfismo do gene TS e a toxicidade ao MTX em outros estudos anteriores.⁶ Ao contrário de alguns estudos prévios, este trabalho também mostrou que os polimorfismos no gene TS não influenciaram a atividade da doença nem a toxicidade ao tratamento com MTX em pacientes com AR em suplementação de folato. Grabar et al.⁸ estudaram um grupo de polimorfismo genético que incluiu o TS e não relataram qualquer relação entre os polimorfismos e parâmetros de atividade da doença, incluindo os valores de VHS, PCR e DAS 28. Em relação aos efeitos adversos decorrentes do tratamento com MTX, os autores encontraram que os polimorfismos TS2R/3R diminuíram a toxicidade da medula óssea no grupo estudado.⁸ Na presença de diferentes combinações de genótipos de risco entre as variantes no gene TS e outros genes, foi relatada uma maior probabilidade de exibir toxicidade.²⁷ A [tabela 8](#) apresenta uma revisão da literatura existente sobre os polimorfismos do gene TS que afetam o tratamento e/ou a toxicidade ao MTX em pacientes com AR.

O MTX inibe a enzima di-hidrofolato-redutase e esgota assim os estoques de folatos reduzidos e produz um estado de deficiência efetiva de ácido fólico.¹ O ácido fólico melhora as taxas de tolerabilidade ao MTX, sem comprometer sua eficácia.^{1,2} O uso de 5 mg/dia de ácido fólico tem sido proposto para todos os pacientes em tratamento com MTX.^{28,29} No presente estudo, todos os pacientes estavam recebendo suplementação de ácido fólico concomitante, o que pode ser uma limitação deste trabalho. Seria útil estudar essas expressões gênicas correspondentes aos efeitos adversos do MTX tanto em pacientes com quanto sem suplementação de ácido fólico. Este estudo incluiu também uma quantidade relativamente pequena de pacientes e nem todos os genes polimórficos envolvidos no metabolismo do MTX foram testados. Portanto, podem ser necessários dados adicionais para que se chegue a resultados mais conclusivos. Contudo, o presente estudo não foi influenciado pela heterogeneidade genética, já que todos os pacientes eram membros de uma população etnicamente homogênea. Estudamos previamente os polimorfismos dos genes MTHFR A1298C e C677T, que não mostraram qualquer relação com a toxicidade ao MTX nesse mesmo grupo de pacientes com AR.³⁰ As discrepâncias entre estudos prévios e o presente estudo podem ser decorrentes das diferenças nas frequências de polimorfismos homozigotos TS2R/3R, uma vez que os indivíduos do presente estudo

Tabela 8 – Revisão da literatura dos polimorfismos do gene TS que afetam o tratamento e/ou a toxicidade ao MTX em pacientes com AR

Autor	Pacientes com AR (n)	Polimorfismos estudados	Eficácia do MTX	Toxicidade ao MTX	Em uso de ácido fólico
Dervieux et al. ²⁶	255	TS 2R/3R (e outros genes)	NS	Toxicidade aumentada	Desconhecido
Dervieux et al. ²	108	TS 2R/3R (e outros genes)	Resposta aumentada ao MTX	Não estudada	1 mg/dia
Takatori et al. ¹⁰	124	Polimorfismo de deleção do TS 6 pb (e outros genes)	NS	NS	Desconhecido
Derwieux et al. ⁶	48	TS 2R/3R (e outros genes)	NS	NS	+ (95% dos pacientes)
Weisman et al. ¹⁸	214	TS2R/3R 3 R (e outros genes)	NS	Alopecia aumentada	+ (81% dos pacientes)
Grabar et al. ⁸	213	TS 2R/3R (e outros genes)	NS	Toxicidade aumentada da medula óssea	+ (62-91% dos pacientes)
Ghodke et al. ⁵	34	Deleção do TS 2R/3R e 6pb	NS	NS	Desconhecido
Inoue et al. ¹¹	36	Deleção do TS 6 pb e 2R/3R	Deleção do 6 pb relacionada com a PCR e melhor resposta ao MTX	Não estudada	5 mg/semana
Kumagai et al. ⁹	105	Deleção do TS 2R/3R e 6pb	Má resposta ao MTX	NS	Desconhecido
Ranganathan et al. ¹³	222	TS 1494 do TTAAAG (e outros genes)	Não estudada	NS	1-3 mg/dia
Zeng et al. ⁷	85	TS 3R/2R	Não estudada	NS	-
Este estudo	64	TS 2R/3R	NS	NS	5 mg/semana

TS, timidilato sintase; MTX, metotrexato; NS, não significativa.

têm frequências mais baixas desses polimorfismos (5 e 6%) do que o relatado por estudos anteriores.^{5,18}

Relatou-se que os níveis de homocisteína plasmática estão relacionados com marcadores inflamatórios em alguns pacientes com AR.^{16,17} Isso concorda com os dados encontrados no presente estudo, que indicam uma relação entre o VHS e os níveis de homocisteína nos indivíduos estudados.

Estudos prévios sobre o efeito do MTX nas concentrações de homocisteína em pacientes com AR mostraram um aumento substancial nessas concentrações durante o tratamento com MTX, um efeito que foi diminuído pela suplementação de ácido fólico.³¹ Os níveis plasmáticos de homocisteína foram medidos em 105 pacientes. Os pacientes com AR que receberam MTX apresentaram um aumento persistente maior na homocisteína plasmática, que foi explicado por um acréscimo adicional do polimorfismo MTHFR. Esses autores concluíram que a homocisteína plasmática pode ser importante na mediação dos efeitos adversos gastrointestinais do MTX.¹⁵ Alguns estudos anteriores especularam que o impedimento no metabolismo da homocisteína mediado pela conversão intracelular do folato era o mecanismo do aumento na frequência de toxicidade em pacientes com o alelo mutante no polimorfismo C677T.^{4,29} No presente estudo, os níveis de homocisteína foram semelhantes entre pacientes e controles saudáveis, o que pode ser decorrente do uso regular de suplementação de ácido fólico por todos os pacientes. Pesquisas anteriores, em concordância com o presente estudo, indicaram que doses de MTX com ácido fólico adjuvante não aumentaram os níveis de homocisteína.²⁸ Mas foram

encontrados níveis de homocisteína mais elevados em pacientes com efeitos adversos decorrentes do MTX do que em pacientes sem efeitos adversos. Isso pode ser explicado pela doença ativa em pacientes que tiveram de diminuir ou interromper o tratamento com MTX em razão dos efeitos adversos.

O metabolismo do metotrexato é complexo e envolve a interação de diversos genes na via do folato. No presente estudo, os polimorfismos 2R e 3R no gene TS não se correlacionaram com a eficácia ou toxicidade ao MTX em pacientes com AR em uso de suplementação de ácido fólico. Especula-se que os efeitos de outros polimorfismos genéticos sobre a sensibilidade à toxicidade ao MTX podem ser mais fortes do que aqueles dos polimorfismos 2R e 3R no gene TS. No entanto, os níveis de homocisteína se correlacionaram com os níveis de VHS; encontrou-se que eram maiores em pacientes com efeitos adversos do que em pacientes sem esses efeitos, o que pode indicar o efeito da homocisteína na atividade da doença e/ou toxicidade ao MTX.

Conclusão

Os níveis de homocisteína podem afetar a atividade da doença e a toxicidade ao MTX, mas os polimorfismos 2R e 3R no gene TS não se correlacionaram com a toxicidade ao MTX em pacientes com AR que recebem suplementação de ácido fólico. São necessários estudos adicionais para esclarecer as razões e os polimorfismos em outras enzimas que podem ser

responsáveis pela toxicidade clínica ao MTX em pacientes com RA.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Ranganathan P, McLeod HL. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(5):1366-77.
- Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier aminoimidazole carboxamid ribonucleotide transformylase and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2766-74.
- Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients: Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* 1986;29:832-5.
- Taniguchi A, Kamatani N. Pharmacogenetic approaches to rheumatoid arthritis. *The Pharmacogenomics Journal.* 2004;4:350-3.
- Ghodke Y, Chopra A, Joshi K, Patwardhan B. Are thymidylate synthase and methylene tetrahydrofolate reductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients? *Clin Rheumatol.* 2008;27:787-9.
- Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3095-103.
- Zeng QY, Wang YK, Xiao ZY, Chen SB. Pharmacogenetic study of 5,10 MTHFR C677T and thymidylate synthase 3R/2R gene polymorphisms and methotrexate-related toxicity in Chinese Han patients with inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(8):1193-4.
- Grabar BP, Logar D, Lestan B, Dolzan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008;64:1057-68.
- Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med.* 2003;11:593-600.
- Takatori R, Takahashi K, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, et al. ABCB1, C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:546-54.
- Inoue S, Hashiguchi M, Takagi K, Kawai S, Mochizuki M. Preliminary study to identify the predictive factors for the response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J Pharmaceutical Soc Japan.* 2009;129(7):843-9.
- Wessels JA, De Vries-Bauststra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single nucleotide polymorphism in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1087-95.
- Ranganathan P, Culverhouse, Marsh S. Methotrexate gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008;5:559-69.
- Marsh S. Thymidylate synthase pharmacogenetics. *Invest New Drugs.* 2005;23:533-7.
- Haagsma CJ, Blom HJ, Van Riel PL, Van't Hof MA, Giesendorf BA, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, et al. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999;58:79-84.
- Fujimaki C, Hayashi H, Tsuboi S, Matsuyama T, Kosuge K, Yamada H, et al. Plasma total homocysteine level and methylene tetrahydrofolate reductase 677C>T genetic polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Biomarkers.* 2009;14:49-54.
- Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Boers GH, Haagsma CJ, Thomas CM, et al. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:658-65.
- Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, et al. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):607-12.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-24.
- Van der Heijde DM, Van't Hof MA, Van Riel PL, Theunisse LA, Lubberts EW, Van Leeuwen MA, et al. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann Rheum Dis.* 1990;49:916-20.
- Bruce B, Fries JF. The Health Assessment Questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23 5 Suppl 39:14-8.
- Senerdem N, Gul A, Konice M, Aral O, Ocal L, Inanc M, et al. The use of two different health assessment questionnaires in Turkish rheumatoid arthritis population and assessment of the association with disability. *Clin Rheumatol.* 1999;18(1):33-7.
- Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magné N, Rosty C, Formento JL, et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol.* 2002;20(12):2832-43.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5' terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct.* 1995;20:191-7.
- Inoue S, Hashiguchi M, Chiyado T, Sunami Y, Tanaka T, Mochizuki M, et al. Pharmacogenetic study of methylenetetrahydrofolate and thymidylate synthase in Japanese and assessment of ethnic and gender differences. *Pharmacogenomics.* 2007;8:41-7.
- Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the TS gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res.* 1999;19:3249-52.
- Derwieux T, Wessels JA, Van der Straaten T, Penrod T, Moore JH, Guchelaar HJ, et al. Gene-gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19812:935-44.
- Whittle SL, Hughes RA. Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumatology.* 2004;43:267-71.
- Morgan SL, Baggott JE. Folate supplementation during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28 5 Suppl 61:102-9.

30. Tasbas O, Borman P, Gurkan Karabulut H, Tukun A, Yorgancıoğlu R. The frequency of A1298C and C677T polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate gene in Turkish patients with rheumatoid arthritis: Relationship to methotrexate toxicity. *Open Rheumatol J*. 2011;5:30-5.
31. Hoekstra M, Haagsma CJ, Doelman CJA, Van de Laar MAFJ. Intermittant rises in plasma homocysteine in patients with rheumatoid arthritis treated with higher dose methotrexate. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:141-3.