

La actividad funcional de los transportadores ABCB1 (P-gp) y ABCG2 (BCRP1) en pacientes con artritis reumatoide (AR) está determinada por la actividad de la enfermedad (AE)

Virginia Pascual-Ramos^{1*}, Yemil Atisha-Fregoso², Guadalupe Lima¹, Hilda Fragoso-Loyo¹,

Juan Jákez-Ocampo¹, Irazú Contreras-Yáñez¹ y Luis Llorente¹

¹Departamento de Inmunología y Reumatología, ²Dirección de Medicina. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, México

Resumen

Antecedentes: La P-gp y el BCRP1 son transportadores cuya actividad se asocia a resistencia a fármacos. **Objetivo:** Comparar la actividad de ambos en pacientes con AR activos e inactivos y definir la relación con la AE. **Métodos:** Se incluyeron 17 pacientes activos pareados (edad, sexo y seguimiento) con 17 inactivos, con evaluaciones en el momento del ingreso; 27 tenían evaluación a los seis meses. La actividad de P-gp y BCRP1 se midió en mononucleares de sangre periférica por citometría de flujo y se expresó como el porcentaje de linfocitos que expulsó el sustrato en presencia/ausencia de inhibidores. Se solicitó consentimiento informado. Se aplicó estadística descriptiva y modelos de regresión lineal.

Resultados: Los pacientes activos tuvieron mayor actividad de ambos transportadores que aquéllos inactivos: mediana (Q25-Q75) para P-gp de 7.1% (1.4-29.3) versus 1.6% (0.7-3.5); y para BCRP1, de 6.2% (1.3-22.4) versus 1.3% (0.7-2); ($p \leq 0.02$). En el momento del ingreso, la AE determinó la actividad de ambos transportadores. A los seis meses, los cambios en la AE se correlacionaron con los cambios en la actividad de P-gp ($r = 0.35$; $p = 0.07$) y BCRP1 ($r = 0.33$; $p = 0.09$).

Conclusiones: Los pacientes activos tuvieron mayor actividad de P-gp y BCRP1 que los inactivos. La AE pareciera determinar la actividad de ambos transportadores.

PALABRAS CLAVE: Transportadores. Actividad. Artritis reumatoide.

Abstract

Background: P-gp and BCRP1 are transporter proteins that may confer drug resistance. **Objective:** To compare P-gp and BCRP1 function in rheumatoid arthritis patients with active and inactive disease and to define their relation with disease activity. **Methods:** We included 17 active patients paired (age, gender, disease duration) to 17 inactive patients. All had baseline evaluations and 27 had additional six-month follow-up. P-gp and BCRP1 functional activity was measured in peripheral mononuclear cells by flow cytometry. Percentage of lymphocytes able to extrude substrates for P-gp and BCRP1 were recorded in the presence/absence of selective inhibitors. Informed consent was obtained. Descriptive statistics and

Correspondencia:

*Virginia Pascual-Ramos

Departamento de Inmunología y Reumatología

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Vasco de Quiroga, 15

Col. Sección XVI, Del. Tlalpan

C.P. 14080, Ciudad de México, México

E-mail: virtichu@gmail.com

Fecha de recepción: 04-09-2015

Fecha de aceptación: 05-10-2015

linear regression model were applied. Results: Active patients had higher efflux function of both transporters than inactive patients: median (25-75 IQR) P-gp of 71% (14-29.3) vs. 1.6% (0.7-3.5), p = 0.02 and BCRP1 of 6.2% (1.3-22.4) vs. 1.3% (0.7-2), p = 0.007. At baseline, disease activity was the only predictor of both transporter functions. At follow-up, changes in disease activity correlated with shift in P-gp ($r = 0.35$, $p = 0.07$) and BCRP1 ($r = 0.33$, $p=0.09$) function. Conclusions: Patients with active rheumatoid arthritis had a higher efflux function of P-gp and BCRP1 compared to inactive patients. The behavior of P-gp and BCRP1 appeared to be conditioned by disease activity. (Gac Med Mex. 2016;152:741-54)

Corresponding author: Virginia Pascual-Ramos, virtichu@gmail.com

KEY WORDS: Disease activity. Rheumatoid arthritis. Transporters.

Introducción

El fenómeno de resistencia múltiple a fármacos fue descrito por primera vez en el cáncer. Se caracteriza por la extrusión de sustancias (contextualmente fármacos) desde el interior de la célula al espacio extracelular mediante transportadores, los cuales ejercen su acción a través de canales dependientes de energía; como consecuencia, el fármaco disminuye su concentración intracelular y, por ende, su eficacia¹. El primer transportador descrito fue la glicoproteína de permeabilidad (P-gp), codificada por el gen *MDR1*²; en la actualidad, se la identifica con el nombre genérico de *ATP-binding cassette (ABC) B1 (ABCB1)*. Otro de los transportadores más estudiados ha sido el ABCG2 o *breast cancer resistant protein 1 (BCRP1)*³. Ambos funcionan como bombas dependientes de energía, con especificidad variable y relacionada fisiológicamente con la secreción de hormonas y la expulsión de toxinas bacterianas fuera de las células. El aumento en la función de ambos transportadores tiene como consecuencia la resistencia a fármacos; éstos, al igual que las toxinas, pueden ser sustratos de los transportadores, lo que impide que los niveles intracelulares alcancen a ser suficientes para que ejerzan su acción terapéutica. En años recientes, el conocimiento generado sobre su papel en la respuesta a la terapia oncológica se ha expandido a otros fármacos como los antivirales⁴ y los inmunosupresores⁵.

La AR es una enfermedad autoinmune y crónica caracterizada por la inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones, con una localización preferente en las articulaciones de las manos y los pies⁶. Tiene una distribución mundial, preferencia por el sexo femenino y una amplia variedad de manifestaciones extraarticulares. El tratamiento temprano, agresivo y dirigido a alcanzar la remisión con fármacos modificadores de la enfermedad (FMDE) impacta favorablemente en los desenlaces de los pacientes⁷⁻⁹. Cabe destacar que, en población latinoamericana, la

enfermedad tiene características distintivas de prevalencia¹⁰, demográficas, de presentación clínica y de respuesta al tratamiento¹¹.

El concepto de artritis temprana (o de reciente inicio) surge hace aproximadamente dos décadas y engloba términos que corresponden a diferentes entidades, como la artritis indiferenciada (que puede progresar o no a AR), las fases tempranas de la AR e inclusive otras entidades¹². La diferenciación de cada una de ellas es fundamental por las implicaciones funcionales en los pacientes. En el contexto clínico de la AR, se ha visto que se alcanza más frecuentemente la remisión en quienes se inicia tratamiento con FMDE con menos de cuatro meses de duración de los síntomas que en quienes se les inicia el tratamiento más tarde¹³. De igual manera, se ha demostrado que se retrasa más efectivamente la progresión radiográfica de la enfermedad en quienes se instaura tratamiento adecuado antes de los tres meses que en quienes se inicia después de 12 meses¹⁴. Dado que la tasa de erosiones es mayor en los dos primeros años del diagnóstico^{15,16}, en la actualidad es más que una recomendación, una necesidad de salud establecer de manera temprana un diagnóstico y un tratamiento adecuados. Lo anterior ha sido posible gracias a herramientas diagnósticas novedosas, entre las cuales destacan los criterios de clasificación propuestos por el Colegio Americano de Reumatología y la Liga Europea en Contra del Reumatismo en el año 2010¹⁷. Además, el marco clínico donde se optimiza el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes son las «clínicas de artritis (reumatoide) temprana».

El impacto económico de la AR es considerable¹⁸, pues la enfermedad afecta a adultos en la cuarta década de la vida y produce incapacidad laboral¹⁹, el tratamiento con FMDE es prolongado y los pacientes requieren frecuentes modificaciones de los tratamientos empleados. En la más reciente actualización de la Guía Mexicana para manejo de la AR²⁰ se incluyen más de 15 FMDE; dado que habitualmente se usan en

forma combinada, las opciones de tratamiento son numerosas; a pesar de ello, más del 50% de los pacientes no responde adecuadamente al tratamiento convencional²¹, lo que implica peores desenlaces clínicos, uso de combinaciones potencialmente más tóxicas y costos incrementados. Por tanto, existe la necesidad de brindar a los pacientes un tratamiento eficaz y racional (y temprano), para lo cual es necesario profundizar en la falta de respuesta al tratamiento. Una hipótesis atractiva es la de que los pacientes con AR activa tengan o adquieran resistencia a FMDE.

En el contexto clínico de la AR son pocos los estudios que han analizado la relación entre la actividad de los transportadores y la respuesta al tratamiento con FMDE y/o corticosteroides, y los resultados han sido ambiguos. En estudios de diseño transversal, se ha evidenciado un aumento en la actividad de la P-gp en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con AR activa²², de pacientes con AR activa previamente tratados con prednisolona²³ y en linfocitos de tejido sinovial de pacientes previamente tratados con FMDE²⁴. Sin embargo, otro grupo de estudio mostró en linfocitos de sangre periférica de pacientes multitratados un incremento en la extrusión de los fármacos y, no obstante, una respuesta (*in vitro*) a los corticosteroides íntegra²⁵. Con respecto a metotrexato, los estudios han sido igualmente contradictorios^{26,27}, si bien en uno de los escasos estudios con diseño longitudinal se demostró que la expresión de la proteína de resistencia múltiple a fármacos (MRP1) involucrada en la extrusión del metotrexato se encontraba inesperadamente regulada a la baja a los seis meses de haber iniciado el tratamiento con dicho fármaco²⁷. Finalmente, se ha descrito actividad inversa de dos transportadores en pacientes con AR y resistencia adquirida a sulfasalazina, de tal manera que la respuesta a los diferentes FMDE puede estar incrementada y disminuida en un mismo paciente en función del tratamiento empleado²⁸⁻³⁰.

Dado que un porcentaje considerable de pacientes con AR tratados persiste con actividad importante, el concepto de resistencia como consecuencia de la extrusión de los FMDE por un incremento en la función de ciertos transportadores es una hipótesis estimulante de trabajo en el marco de una clínica de AR temprana, en la cual se realiza un seguimiento riguroso de los pacientes.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Determinar y comparar la actividad de los transportadores P-gp y BCRP1 en pacientes con AR

activos y pacientes con AR inactivos (o en remisión).

- Investigar asociaciones entre las dosis de corticosteroides y/o FMDE y la actividad de los transportadores P-gp y BCRP1.
- Investigar el impacto de la AE en la actividad funcional de los transportadores P-gp y BCRP1.

Material y métodos

Población de estudio: Clínica de Artritis Temprana

Los pacientes fueron seleccionados de la Clínica de Artritis Temprana del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Brevemente, la clínica inició en febrero del año 2004 con la finalidad de identificar y tratar tempranamente a pacientes con sospecha de AR y síntomas de menos de 12 meses de duración. Está constituida por un equipo multidisciplinario (reumatólogo, enfermera y trabajadora social) que realiza un seguimiento exhaustivo de los pacientes, el cual incluye evaluación de la AE (cuenta de articulaciones inflamadas y dolorosas, reactantes de fase aguda, evaluación del médico y desenlaces reportados por el paciente), de la progresión radiográfica (toma de radiografías de manos y pies con periodicidad anual), de la respuesta y apego al tratamiento, de la presencia de comorbilidades y de eventuales complicaciones y/o eventos adversos. El seguimiento de los pacientes es cada seis u ocho semanas durante los dos primeros años y posteriormente cada dos, cuatro o seis meses en función del estado clínico de cada paciente. El tratamiento incluye el uso de FMDE y va dirigido a alcanzar la remisión. Aunado a la labor asistencial, la clínica se diseñó para el desarrollo de investigación en AR en nuestro país, y cuenta con bases de datos actualizadas con información relativa a desenlaces clínicos, serológicos, radiológicos y funcionales de los pacientes a lo largo del seguimiento, así como con un banco de sangre, de material genético y biológico.

Hasta la fecha se han reclutado 187 pacientes, de los cuales 160 tienen seguimiento activo, dos han fallecido, siete tienen un diagnóstico diferente al de AR y 18 se han perdido en el seguimiento (más de un año sin acudir a la consulta). La clínica tiene más de 10 años de experiencia y, por ende, el 4% de los pacientes tiene menos de un año de evolución (ingreso reciente), el 30% de uno a cinco años de evolución y el 66% más de cinco años de evolución³¹⁻⁴⁰.

Diseño del estudio y definición de las variables

Se trata de un estudio de casos y controles anidado en la cohorte de pacientes con AR temprana.

Se consideró caso a todo paciente con AR de acuerdo a dos grupos de criterios internacionales de clasificación^{17,41}, quien tuvo un índice de actividad de la enfermedad 28 (DAS28) ≥ 3.2 en el momento de la inclusión al estudio⁴² a pesar de recibir dosis terapéuticas y estables (cuando menos dos meses) de FMDE.

Se consideró control a todo paciente con AR con los mismos criterios arriba mencionados salvo el relativo a la actividad en el momento de la inclusión al estudio; el control se definió como en remisión, es decir, DAS28 < 2.6.

Cada caso fue pareado con su respectivo control (1:1) de acuerdo a las siguientes variables: edad (± 10 años), sexo y tiempo de evolución de la enfermedad o de seguimiento en la clínica (± 5 años).

El nivel de AE se definió de acuerdo al valor del DAS28 en cuatro categorías: alta, media, baja y remisión⁴².

Evaluación de los pacientes y obtención de las muestras

Las evaluaciones que a continuación se detallan se realizaron en el momento de la inclusión de los pacientes al estudio y a los seis meses de seguimiento. La estrategia de inclusión de pacientes fue primero identificando a los casos y en un tiempo no superior a una semana se incluyeron los controles adecuadamente pareados.

La evaluación clínica incluyó:

- Una breve entrevista para corroborar datos socio-demográficos, investigar síntomas de AE, confirmar el tratamiento y apego al mismo y definir la presencia de comorbilidades.
- Identificación y cuenta de articulaciones inflamadas y dolorosas (28 posibles localizaciones)⁴².
- Determinación de reactantes de fase aguda en suero (velocidad de sedimentación globular y proteína C reactiva [PCR]).
- Aplicación al paciente de escala visual análoga de dolor y del estado general de la enfermedad, y de cuestionarios de autoevaluación, validados al español, para definir actividad, fatiga, dolor, discapacidad y calidad de vida³⁵.
- Cálculo del DAS28.
- Toma de 5 ml de sangre periférica para la medición por citometría de flujo de la actividad funcional de los transportadores P-gp y BCRP1.

Procesamiento de las muestras

Todas las muestras fueron procesadas en un lapso no superior a 1 h tras la toma de las mismas.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (anticoagulada con 2% de ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]) por gradiente de centrifugación con Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega). Despues de dos lavados, las células mononucleares se contaron, ajustaron a 3×10^6 /ml y se hicieron tres alícuotas de 1×10^6 . La actividad de P-gp se midió incubando las células en presencia de 60 μ l de 400 μ M de daunorubicina (Sigma-Aldrich, San Louis, MO), sustrato fluorescente de P-gp, por 1 h en las siguientes condiciones: 1×10^6 a 4 °C (como control negativo de extrusión), 1×10^6 a 37 °C (para permitir la extrusión) y 1×10^6 a 37 °C con 5 μ l de verapamilo (Sigma-Aldrich, San Louis, MO) de 50 mM (inhibidor de P-gp). Para medir la actividad de BCRP1 se agregaron 20 μ l de mitoxantrona (Sigma-Aldrich, San Louis, MO) 500 μ M (sustrato fluorescente de BCRP1) a 3×10^6 células y como inhibidor se utilizaron 75 μ l de KO143 (Sigma-Aldrich, San Louis, MO) de 10 μ M (inhibidor específico de BCRP1), incubando en las mismas condiciones previamente descritas. Posteriormente, se lavaron las muestras con *Phosphate Buffered Saline* (PBS) frío, centrifugando 10 min a 1,600 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en *phosphate buffered saline* (PBS) frío conservándose en hielo hasta su análisis. La citometría de flujo se realizó en un equipo FACS Canto II (BD Biosciences, San José, CA). La fluorescencia de daunorubicina se analizó con un láser de helio neón a 488 nm y la de mitoxantrona utilizando un láser de argón a 633 nm. En todos los casos se adquirieron 20,000 eventos y se usó el programa de análisis BD FACSDiva (Figs. 1 y 2).

La actividad funcional de cada transportador se expresó como el porcentaje de linfocitos que expulsaron el sustrato (daunorubicina para P-gp y mitoxantrona para BCRP1). Se definió resistencia de los transportadores P-gp y BCRP1 cuando el porcentaje de extrusión fue mayor de 1.67% de los linfocitos. Dicho punto de corte se estableció con base en la actividad de ambos transportadores determinada en 25 sujetos sanos (media + 2 desviaciones estándar [DE]).

Consideraciones éticas

La clínica fue aprobada por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del INCMNSZ,

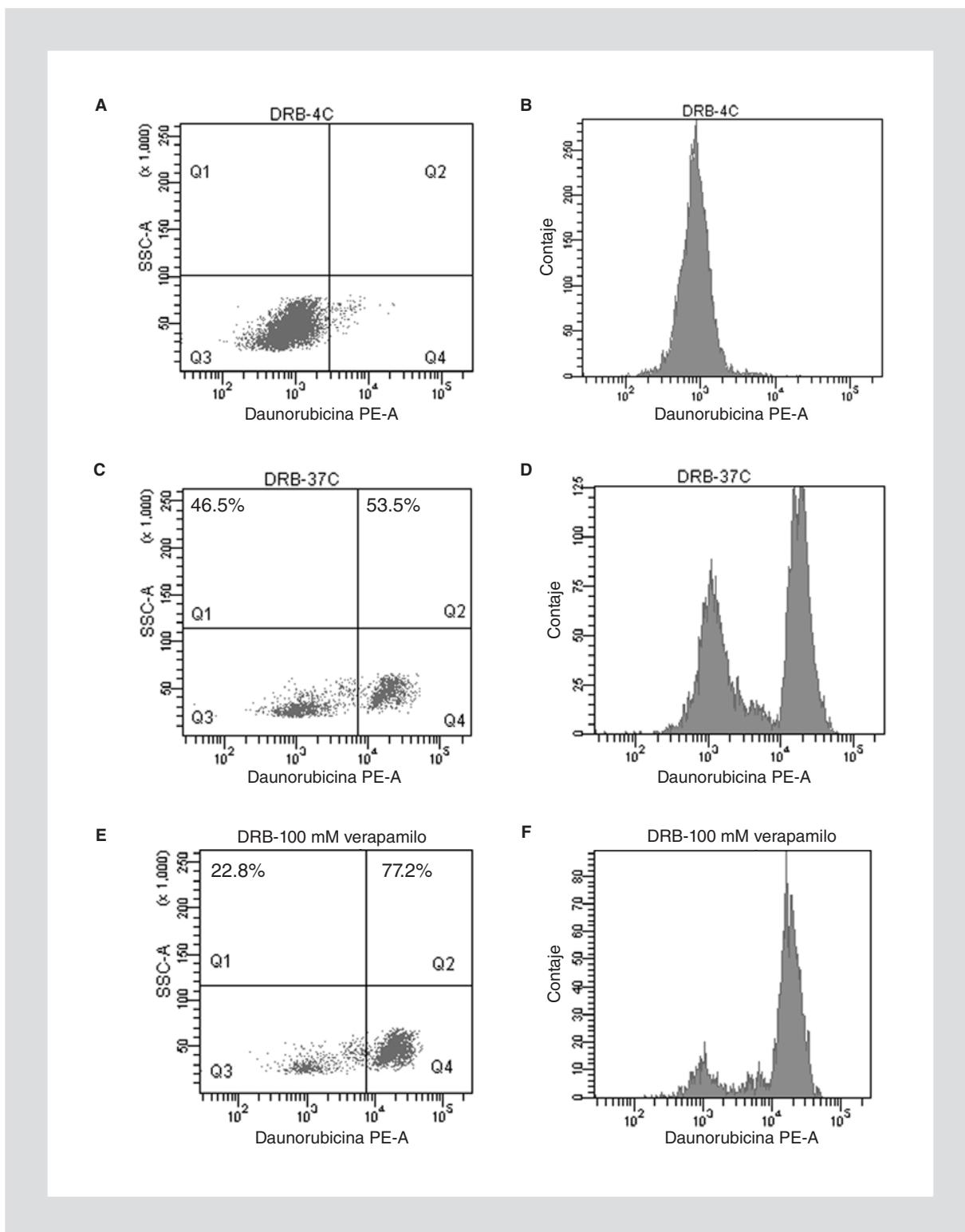


Figura 1. Actividad funcional de la P-gp en linfocitos de pacientes con AR. La figura muestra un experimento representativo de linfocitos expulsores de daunorubicina en un paciente con AR y enfermedad activa. **A** y **B**: citograma e histograma de linfocitos incubados a 4 °C en presencia de daunorubicina. **C** y **D**: citograma e histograma de linfocitos incubados a 37 °C en presencia de daunorubicina. Tanto los linfocitos no expulsores (mayor intensidad de fluorescencia a la derecha [53.5%]) como los expulsores (menor intensidad de fluorescencia a la izquierda [46.5%]) son claramente evidentes. **E** y **F**: citograma e histograma de linfocitos incubados a 37 °C en presencia de daunorubicina y verapamilo (inhibidor competitivo de sustratos de la P-gp). La inhibición *in vitro* se aprecia claramente al comparar los histogramas en **D** y **F**. La línea de corte de positividad se estableció como 2 DE por encima de la media del grupo de control (1.67% de linfocitos expulsores de daunorubicina).

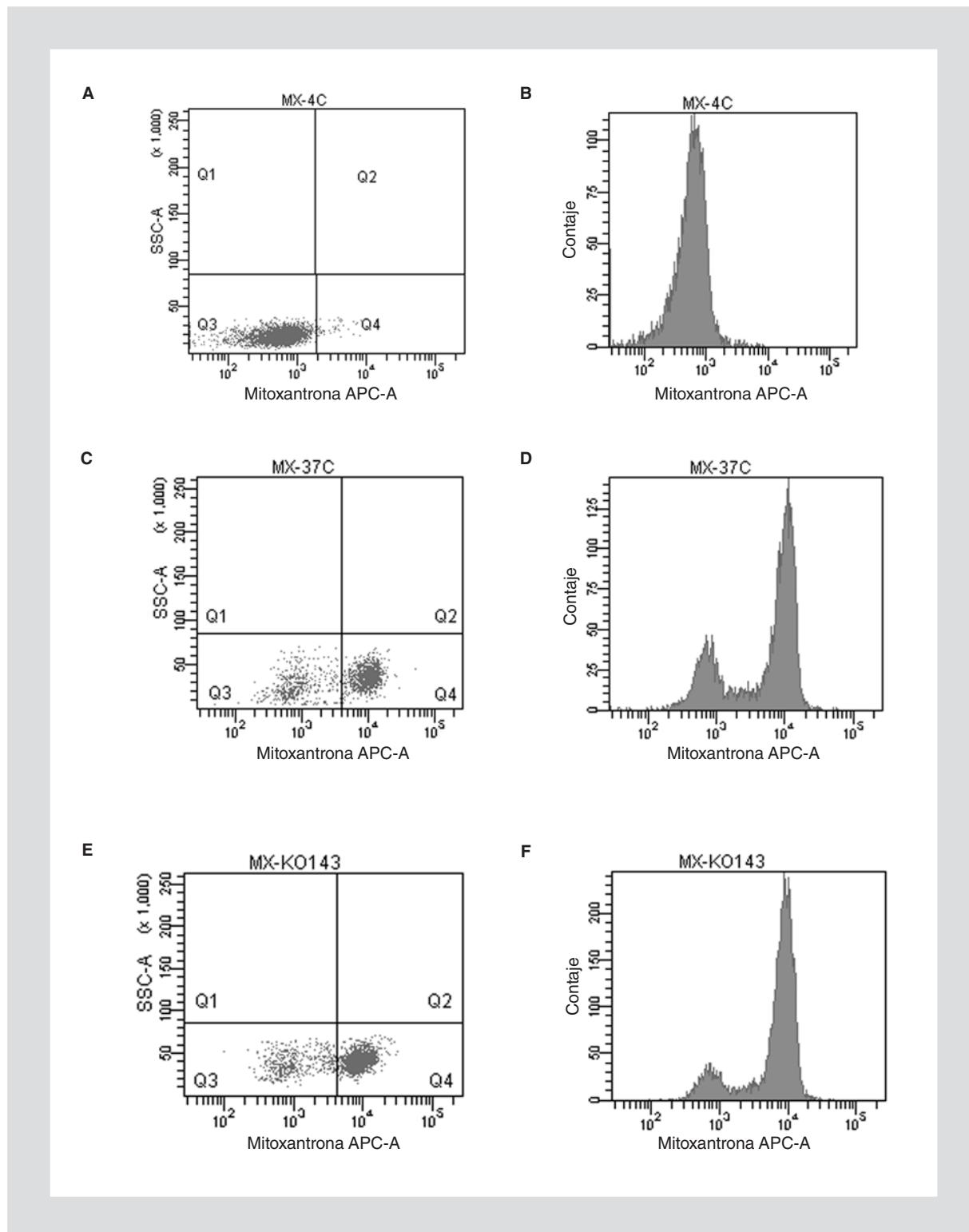


Figura 2. Actividad funcional de BCRP1 en linfocitos de pacientes con AR. La figura muestra un experimento representativo de linfocitos expulsores de mitoxantrona en un paciente con AR y enfermedad activa. **A** y **B**: citograma e histograma de linfocitos incubados a 4 °C en presencia de mitoxantrona. **C** y **D**: citograma e histograma de linfocitos incubados a 37 °C en presencia de mitoxantrona. Tanto los linfocitos no expulsores (mayor intensidad de fluorescencia a la derecha [66.7%]) como los expulsores (menor intensidad de fluorescencia a la izquierda [33.3%]) son claramente evidentes. **E** y **F**: citograma e histograma de linfocitos incubados a 37 °C en presencia de mitoxantrona y KO143 (inhibidor competitivo de sustratos de BCRP1). La inhibición *in vitro* se aprecia claramente al comparar los histogramas en **D** y **F**. La línea de corte de positividad se estableció como 2 DE por encima de la media del grupo de control (1.67% de linfocitos expulsores de mitoxantrona).

al igual que el presente proyecto (Referencia: 1128). Todos los pacientes firmaron consentimiento informado para someterse a las evaluaciones de la clínica, otorgar muestras de sangre, revisar sus expediente clínicos y publicar los datos obtenidos del presente estudio.

Análisis estadístico

El tamaño de la muestra se calculó con base en la hipótesis primaria del estudio, es decir, que los pacientes con AR en remisión tienen un menor porcentaje de actividad funcional de los transportadores P-gp y BCRP1 que los pacientes con AE, tomando en cuenta una diferencia estimada para los promedios del porcentaje de extrusión por citometría de flujo. Se estimó una diferencia de 30 puntos porcentuales entre ambos grupos, con un poder del 80% y un alfa de 0.025 debido a la presencia de dos hipótesis primarias (por el análisis de dos transportadores), por lo cual se requería un total de nueve pacientes por grupo (18 en total). Sin embargo, intentando lograr una normalización de la distribución de los resultados y considerando el análisis multivariado con las variables de tratamiento, por conveniencia se decidió incluir un total de 40 pacientes (20 por grupo).

Estrategia del análisis estadístico

Para el análisis descriptivo de datos se utilizaron frecuencias relativas e índices de tendencia central y dispersión adecuados a la forma de distribución y nivel de la escala de medición. Para la comparación de las variables continuas se utilizaron t de Student y U de Mann-Withney o prueba de rangos señalados de Wilcoxon de acuerdo a la distribución de las variables. Para conocer el grado de correlación entre la AE y las dosis puntuales o acumuladas de medicamentos durante el último año, con la medición de la actividad de los transportadores, se utilizó Rho de Spearman. Finalmente, el análisis multivariado para establecer la asociación de la AE con el valor de la actividad de ambos transportadores (de forma independiente cada una) ajustada para las dosis de medicamentos recibidas, se realizó mediante un modelo de regresión lineal múltiple incluyendo aquellos medicamentos que resultaron con asociación significativa para cada transportador.

Se asumió como significativa una $p \leq 0.05$ a dos colas. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 20.

Resultados

En el presente trabajo se reportan los resultados preliminares obtenidos tras el análisis de las primeras 17 parejas de casos y controles, con un total de 34 pacientes con AR, de los cuales 27 tuvieron seguimiento a los seis meses.

Características generales de la población del estudio

En la tabla 1 se presentan las características más relevantes de la población en el momento del ingreso al estudio. La mayoría fueron mujeres (94.1%), en la cuarta década de la vida (edad media \pm DE: 41.6 ± 10.8 años), con educación básica completa (media \pm DE años de educación: 10.6 ± 4.2); en general, los pacientes incluidos tenían (en el momento del ingreso a la clínica) factor reumatoide (FR) positivo (85.3%) y anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (APCC) positivos (97.5%), (media \pm DE) tiempo de evolución de 6.3 ± 3.5 años y cuando menos una comorbilidad (82.4%). Todos los pacientes recibían algún FMDE, siendo el número (media \pm DE) de FMDE/paciente de 1.7 ± 0.9 ; además, 27 pacientes (79.4%) recibían adicionalmente corticosteroides orales y la dosis promedio (\pm DE) por día equivalente a prednisona fue de $8.1 \text{ mg} (\pm 4.2)$.

No hubo diferencia en las variables de pareamiento entre los casos (pacientes activos) y los controles (Tabla 1). Comparados con los controles, los casos tuvieron mayor actividad clínica de la enfermedad, con un DAS28 (media \pm DE) al ingreso al estudio de 4.8 ± 1.3 versus 1.2 ± 0.6 ($p \leq 0.001$) y mayor actividad serológica, con una concentración de PCR (media \pm DE) de 1.6 ± 1.2 versus $0.2 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$ ($p \leq 0.001$). Los casos también tuvieron mayores dosis diarias de corticosteroides (media \pm DE) al ingreso al estudio y mayores dosis acumuladas en el año previo que los controles: 10.1 ± 5 versus $6.3 \pm 2.1 \text{ mg/día}$ en equivalente de prednisona ($p = 0.03$) y 4041.2 ± 1848.7 versus $2348.5 \pm 859.5 \text{ mg}$ ($p = 0.004$), respectivamente. El uso de FMDE fue similar en ambos grupos.

Actividad de los transportadores en el momento del ingreso al estudio

La tabla 2 y la figura 3 resumen los resultados relevantes. Los pacientes con AE ($DAS28 \geq 3.2$) tuvieron más frecuentemente resistencia de los transportadores P-gp y BCRP1 que los pacientes en remisión ($DAS28$

Tabla 1. Características generales de los pacientes a su ingreso al estudio y comparación entre pacientes activos (casos) y en remisión (controles)

	Población total (n = 34)	Pacientes con AR activa (n = 17)	Pacientes con AR en remisión (n = 17)	p
Características demográficas				
Número de pacientes (%) de sexo femenino	32 (94.1)	16 (94.1)	16 (94.1)	1
Edad, años, al ingreso al estudio*	41.6 ± 10.8	43.5 ± 12.1	39.6 ± 9.1	0.30
Número de pacientes (%) fumadores al ingreso al estudio	4 (11.8)	2 (11.8)	2 (11.8)	1
Años de educación completa al ingreso a la clínica*	10.6 ± 4.2	9.5 ± 4.7	11.6 ± 3.4	0.15
Características propias de la AR				
Tiempo de evolución de la AR, años, al ingreso al estudio*	6.3 ± 3.5	6.6 ± 3.9	6 ± 3.2	0.61
DAS28 al ingreso al estudio*	3 ± 2.1	4.8 ± 1.3	1.2 ± 0.6	≤ 0.001
PCR al ingreso al estudio (mg/dl)*	0.9 ± 1.1	1.6 ± 1.2	0.2 ± 0.2	≤ 0.001
Número de pacientes (%) con enfermedad erosiva al ingreso al estudio	17 (50)	10 (58.8)	7 (41.2)	0.49
Número de pacientes (%) con FR al ingreso a la clínica	29 (85.3)	15 (88.2)	14 (82.4)	1
Número de pacientes (%) con APCC al ingreso a la clínica	33 (97.5)	16 (94.1)	17 (100)	1
Comorbilidades al ingreso al estudio				
Número de pacientes (%) con ≥ 1 comorbilidad	28 (82.4)	14 (82.4)	14 (82.4)	1
Puntaje de Charlson*	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0.66
Tratamiento al ingreso al estudio				
Número de pacientes (%) con corticosteroides	27 (79.4)	13 (76.5)	14 (82.4)	1
Dosis de corticosteroides/paciente (mg/día)*†	8.1 ± 4.2	10.1 ± 5	6.3 ± 2.1	0.03
Dosis de corticosteroides acumulada/paciente en el año previo*	3134.4 ± 1625.2	4041.2 ± 1848.7	2348.5 ± 859.5	0.004
Número de FMDE/paciente*	1.7 ± 0.9	1.7 ± 0.9	1.8 ± 0.8	0.85

*Media ± DE

†Equivalente a mg/día de prednisona, sólo en quienes recibían prednisona.

< 2.6): 12 pacientes (70.6%) versus 8 (47.1%) ($p = 0.3$) y 12 pacientes (70.6%) versus 6 (35.3%) ($p = 0.08$); el porcentaje de actividad funcional de cada transportador (mediana, rango intercuartílico) fue mayor en los pacientes con DAS28 ≥ 3.2 que en los pacientes en remisión: 7.1% (1.4-29.3) versus 1.6% (0.7-3.5) ($p = 0.02$) y 6.2% (1.3-22.4) versus 1.3% (0.7-2) ($p = 0.007$). Se obtuvieron resultados similares al analizar al subgrupo de pacientes con AR y resistencia a P-gp ($n = 12$) y BCRP1 ($n = 12$) (Tabla 2 y Fig. 3).

Finalmente, ambos transportadores, P-gp y BCRP1, se correlacionaron de manera significativa con la AE,

evaluada por DAS28: Rho de 0.45 ($p = 0.008$) y 0.52 ($p = 0.002$), respectivamente (Figs. 4 y 5).

Correlación de actividad funcional de P-gp y BCRP1 con dosis de medicamentos

Para cada paciente se determinó la dosis de medicamento en el momento del ingreso al estudio y acumulada en el año previo a su inclusión; los medicamentos analizados fueron corticosteroides (dosis equivalente de prednisona), metotrexato, cloroquina

Tabla 2. Número de pacientes (%) con AR activos (casos) y en remisión (controles) con resistencia de P-gp y BCRP1 y los respectivos porcentajes de actividad funcional de ambos transportadores

	Pacientes con enfermedad activa (DAS28 ≥ 3.2) (n = 17)	Pacientes en remisión (DAS28 < 2.6) (n = 17)	p
P-gp			
Número de pacientes (%) con resistencia de P-gp	12 (70.6)	8 (47.1)	0.30
Mediana (Q25-Q75) del % de actividad funcional en todos los pacientes	7.1 (1.4-29.3)	1.6 (0.7-3.5)	0.02
Mediana (Q25-Q75) del % de actividad funcional en los pacientes con resistencia de P-gp (n = 12)	19.7 (6.9-38.4)	3.5 (2.9-9.1)	0.01
BCRP1			
Número de pacientes (%) con resistencia de BCRP1	12 (70.6)	6 (35.3)	0.08
Mediana (Q25-Q75) del % de actividad funcional en todos los pacientes	6.2 (1.3-22.4)	1.3 (0.7-2)	0.007
Mediana (Q25-Q75) del % de actividad funcional en los pacientes con resistencia de BCRP1 (n = 12)	11.4 (4.2-32.8)	2.49 (2-4)	0.02

(o hidroxicloroquina), azulfidina, leflunomida (un paciente) y azatioprina (un paciente). En la tabla 3 se resumen los resultados de toda la población al ingreso al estudio, de los medicamentos más frecuentemente indicados. No hubo diferencia en la dosis (puntual o acumulada) de los medicamentos entre los pacientes con resistencia de los transportadores y los pacientes sin resistencia. Asimismo, no hubo correlación entre el porcentaje de actividad funcional de cada transportador (P-gp y BCRP1) y las dosis de los diferentes fármacos (datos no mostrados).

Impacto de la AE en la actividad funcional de los transportadores

El modelo de regresión lineal con los datos basales de los 34 pacientes mostró que el DAS28 fue el único predictor de la actividad funcional de P-gp (coeficiente beta: 0.50; intervalo de confianza [IC] 95%: 1.6-6.7; p = 0.002; R² = 0.23) y BCRP1 (coeficiente beta: 0.48; IC 95%: 1.4-6.8; p = 0.004; R² = 0.21).

En el momento del análisis de los datos aquí presentados, 27 pacientes completaron seis meses de seguimiento: cuatro de ellos (14.8%) incrementaron el nivel de actividad de acuerdo al DAS28, 13 (48.1%) mantuvieron el mismo nivel y 10 (37.1%) disminuyeron el nivel de AE. A los seis meses, se incrementó el número de pacientes con resistencia de ambos transportadores, si bien el incremento fue menor en los pacientes con mejoría de la AE (Tabla 4); de manera similar, la

magnitud del incremento de la actividad funcional de los transportadores fue menor en los pacientes con mejoría clínica (Tabla 4, p sin significancia estadística).

Finalmente, se correlacionaron las diferencias del DAS28 (entre la evaluación basal y a los seis meses) y las diferencias en la actividad funcional de ambos transportadores, encontrándose una correlación moderada y con tendencia significativa: r = 0.35 (p = 0.07) para P-gp y r = 0.33 (p = 0.09) para BCRP1 (Fig. 6).

Discusión

Existe información limitada acerca de la participación de los transportadores P-gp y BCRP1 en las enfermedades reumáticas autoinmunes. En pacientes que requieren de la administración de fármacos anti-inflamatorios y/o de FMDE, un incremento en la función de éstos por células del sistema inmune pudiera estar asociado con un efecto terapéutico insuficiente. En AR, la respuesta a la terapia juega un papel determinante en el pronóstico de los pacientes. Más aún, no existe actualmente una fórmula precisa ni una combinación de medicamentos que haya demostrado ser universalmente efectiva. Son numerosas las razones que se pueden invocar, si bien una de ellas se fundamenta en la respuesta idiosincrásica de los pacientes a las dosis, las combinaciones y los períodos de los distintos tratamientos terapéuticos, en el marco conceptual de un tratamiento que aún hoy, se considera de por vida. Entre los fármacos más frecuentemente

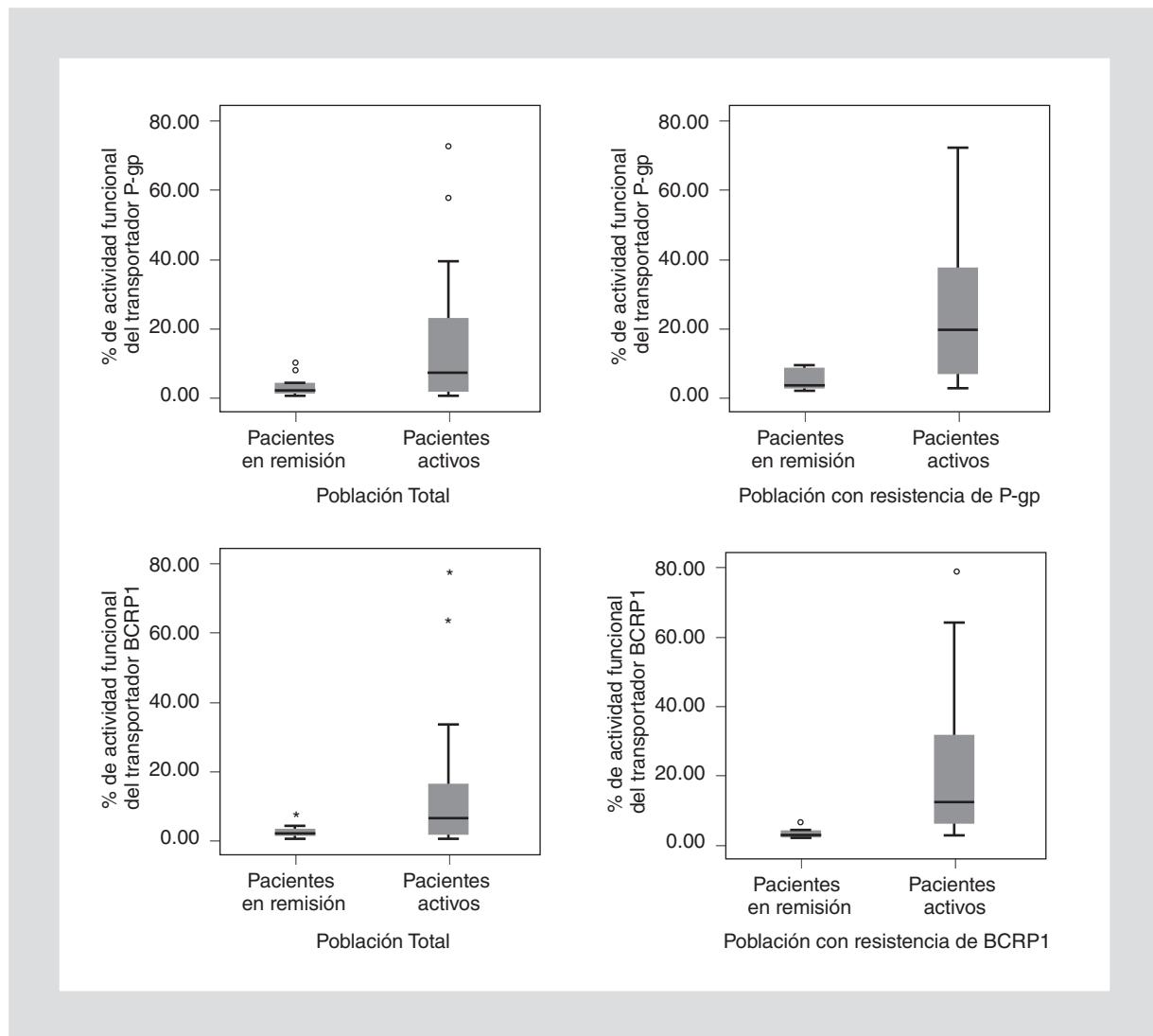


Figura 3. Porcentaje de actividad funcional de P-gp y BCRP1 en pacientes con AR (casos) y pacientes en remisión (controles). La figura muestra el porcentaje de actividad funcional de P-gp (paneles superiores) y BCRP1 (paneles inferiores) en pacientes con enfermedad activa y pacientes en remisión. Los paneles de la izquierda muestran el análisis en toda la población y los de la derecha, en la población de pacientes con AR y resistencia a los transportadores. Cada caja representa la mediana (barra horizontal en negrita), los percentiles 25 y 75 (límites inferior y superior de la caja) y el mínimo y el máximo (líneas sobresalientes).

empleados destacan la prednisona, los antipalúdicos (cloroquina e hidroxicloroquina), el metotrexato, la leflunomida y la sulfasalazina, los cuales son sustratos de la P-gp (los dos primeros) y del transportador BCRP1 (los tres últimos).

En el presente trabajo se observó que los pacientes con AE fueron los que presentaron, a su vez, mayor actividad de los transportadores P-gp y BCRP1 y mayor resistencia por parte de éstos. Además, se evidenció una correlación significativa entre ambos transportadores con la AE. Finalmente, ésta, evaluada a través de un índice compuesto validado, fue el único predictor de la actividad funcional de la P-gp y del BCRP1

en las muestras basales, presentando una tendencia similar cuando se incluyeron las muestras a los seis meses de seguimiento. A este respecto, cabe subrayar que una de las funciones fisiológicas de ambos transportadores es la destoxicificación celular, por lo que no se puede descartar que la hiperfuncionalidad de ambas proteínas sea el resultado de la suma algebraica de esquemas terapéuticos con múltiples agentes y de la secreción activa de mediadores de la inflamación, pero no necesariamente un defecto inherente a la enfermedad. Así, se sabe que varias citocinas como el FNT- γ , la interleucina (IL) 2, la IL-12 y el IFN- γ , (interferón) son sustratos de los transportadores de la familia

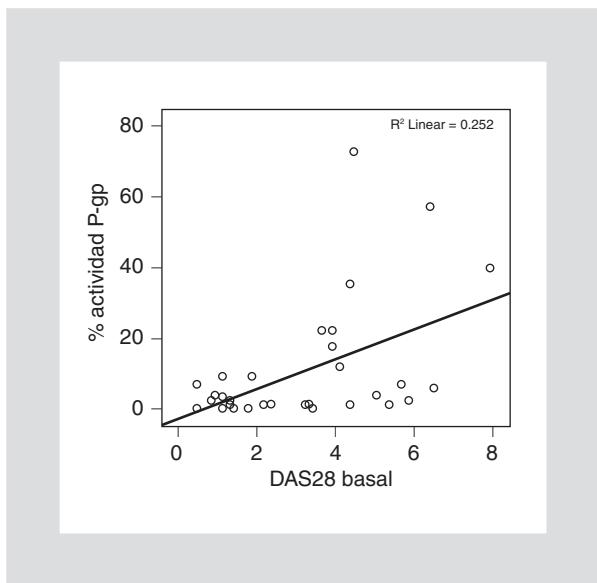


Figura 4. Correlación entre la actividad funcional de P-gp y la AE evaluada por DAS28. La figura muestra la correlación entre la actividad funcional de P-gp (línea ordenada) y la AE de acuerdo al DAS28 (línea abscisa).

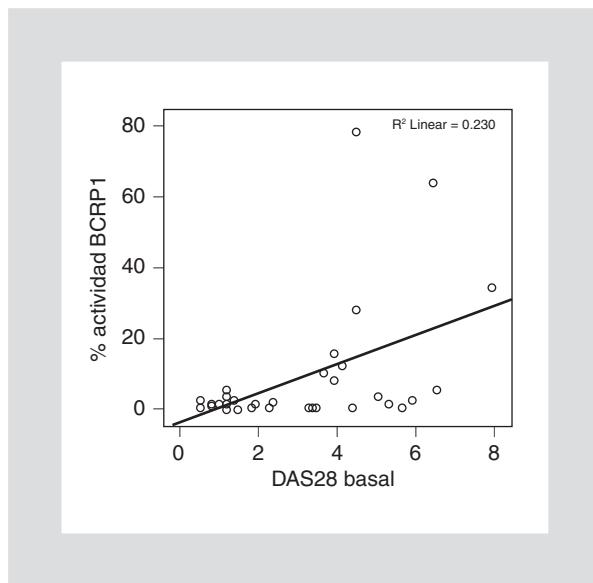


Figura 5. Correlación entre la actividad funcional de BCRP1 y la AE evaluada por DAS28. La figura muestra la correlación entre la actividad funcional de BCRP1 (línea ordenada) y la AE de acuerdo al DAS28 (línea abscisa).

Tabla 3. Tratamiento en el momento del ingreso al estudio y acumulado en toda la población de pacientes con AR; incluye corticosteroides y los FMDE más frecuentemente indicados

	Población general (n = 34)
Número de pacientes (%) con corticosteroides	27 (79.4)
Prednisona/paciente (mg/día)*	7.5 (5-10)
Miligramos de prednisona acumulados en año previo/paciente*	2807.5 (1880.6-3773.8)
Número de pacientes (%) con metotrexato	30 (88.2)
Metotrexato (mg/semana), mediana (mín-máx)*	25 (23.8-25)
Miligramos de metotrexato acumulados en año previo/paciente*	1303.6 (930.5-1303.6)
Número de pacientes (%) con cloroquina	12 (35.3)
Cloroquina/paciente (mg/día)*	150 (150-150)
Miligramos de cloroquina acumulados en año previo/paciente*	39.700 (26.700-54.862.5)
Número de pacientes (%) con azulfidina	13 (38.2)
Azulfidina/paciente (g/día)*	2 (2-3)
Gramos de azulfidina acumulados en año previo/paciente*	493 (295.6-714.8)

*Mediana (Q25-Q75): los datos se obtienen de la subpoblación que tomaba dicho medicamento.

ABC incluidos la P-gp y el BCRP1⁴³. Interesantemente, se ha mostrado que el bloqueo *in vitro* de ambos transportadores con quimiosensibilizadores tales como el verapamilo y el KO143 ha sido capaz de inhibir tanto la resistencia a algunos FMDE como la secreción

de citocinas proinflamatorias, particularmente el FNT- α , el cual juega un papel protagónico en la fisiopatología de la AR⁴⁴.

Una de las fortalezas del presente trabajo es el marco clínico en el cual se desarrolló. La población de

Tabla 4. Resistencia de transportadores y actividad funcional de los mismos a los seis meses de seguimiento de acuerdo a la evolución clínica de los pacientes

Comportamiento de la enfermedad a los 6 meses	DAS28 a los 6 meses*	Número de pacientes (%) con resistencia	p	% de actividad funcional a los 6 meses*	p	Número de pacientes (%) que incrementan la actividad funcional	p	Incremento del % de actividad funcional*	p
Transportador P-gp									
Pacientes que empeoran, (n = 4)	3 (2.7-3)	3 (75)	0.4	9 (0-22)	0.5	3 (75)	0.6	3.7 (3.7-21.6)	0.9
Pacientes que se mantienen con el mismo nivel de actividad, (n = 13)	2 (1-4)	12 (92)	0.4	5 (2.8-23)	0.5	10 (77)	0.6	4.4 (1.3-16.1)	0.9
Pacientes que mejoran, (n = 10)	2.4 (1.8-3)	7 (70)	0.4	2.5 (1.2-21)	0.5	5 (50)	0.6	2.7 (0.6-37.7)	0.9
Transportador BCRP1									
Pacientes que empeoran, (n = 4)	3 (2.7-3)	3 (75)	0.4	12 (0-20)	0.8	3 (75)	0.4	13.9 (7.3-19.7)	0.7
Pacientes que se mantienen con el mismo nivel de actividad, (n = 13)	2 (1-4)	12 (92)	0.4	4 (2.7-28)	0.8	11 (85)	0.4	3.1 (1.5-31.9)	0.7
Pacientes que mejoran, (n = 10)	2.4 (1.8-3)	7 (70)	0.4	3 (1-19.8)	0.8	6 (60)	0.4	6.2 (2-27)	0.7

*Mediana (Q25-Q75).

estudio incluyó a pacientes con AR de poco tiempo de evolución, y con un seguimiento activo y estandarizado. La gran mayoría de los pacientes tuvieron autoanticuerpos (FR y APCC), los cuales confieren homogeneidad serológica y pronóstica a la población, pues ambos condicionan peores desenlaces de la enfermedad, como una mayor actividad clínica y la progresión radiológica^{45,46}; por otra parte, el seguimiento de los pacientes fue riguroso, ya que se aplicaron regularmente índices internacionales de actividad y respuesta validados en nuestra población. Con respecto al tratamiento, éste se recopiló con un instrumento también estandarizado y se corroboró con una evaluación de la adherencia, por lo cual fue posible determinar con exactitud el tratamiento acumulado real e investigar su posible asociación con la actividad funcional de ambos transportadores. A este respecto, cabe

mentionar que, si bien es cierto que los pacientes incluidos tuvieron una media de seguimiento corta, de seis años, desde el punto de vista del medicamento acumulado la dosis fue considerable; se ha descrito que el uso de ciertos medicamentos induce la expresión de transportadores⁴⁷; sin embargo, se desconoce si lo anterior viene determinado por el tiempo de uso, por las dosis acumuladas, por la combinación de los tratamientos empleados o por la suma de todo lo anterior. Si bien no encontramos una asociación entre la dosis de medicamento acumulada en el año previo y la actividad de los transportadores, pudiera tener que ver con las características de nuestra población en el momento del ingreso al estudio, ya previamente tratada. Idealmente, la actividad funcional de los transportadores debiera de medirse en pacientes vírgenes a tratamiento (poco probable por el tipo de institución

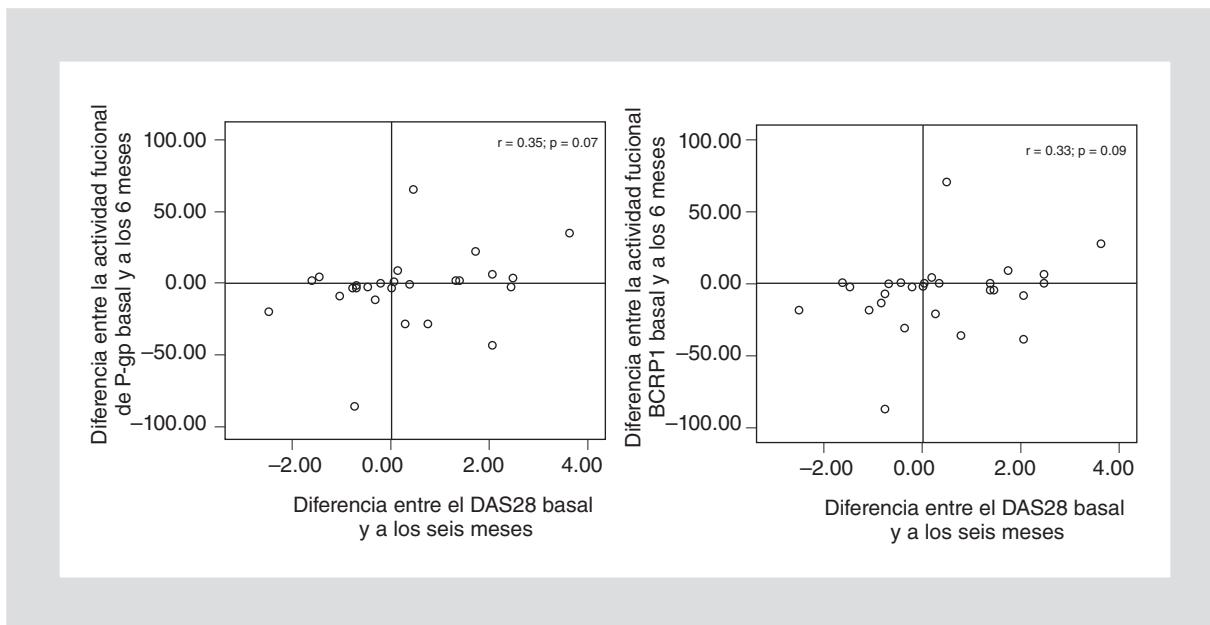


Figura 6. Correlación entre los cambios (a los seis meses de seguimiento) en el DAS28 y en la actividad funcional de los transportadores. La figura representa la correlación entre los cambios en el DAS28 (línea abscisa) y los cambios en la actividad funcional de los transportadores P-gp (panel de la izquierda) y BCRP1 (panel de la derecha). Cada panel está dividido por una línea vertical, la cual representa que no hay variación en el DAS28, y una línea horizontal, que representa que no hay variación en la actividad funcional del transportador. Cada punto representa un paciente. Los puntos localizados a la derecha de la línea vertical representan a pacientes con incremento en la AE (y viceversa). Los puntos localizados por encima de la línea horizontal representan a pacientes con incremento en la actividad funcional del transportador.

en la cual trabajamos) o poco de tiempo después de haberlo iniciado. Dicho estudio está siendo desarrollado actualmente en la clínica de AR temprana.

Otro punto a resaltar como fortaleza del trabajo es el procedimiento empleado para detectar la actividad funcional de los transportadores mediante la medición de la expulsión de compuestos fluorescentes dependientes de P-gp y BCRP1, a saber daunorubicina, rodamina 123 y/o mitoxantrona. Con tales sustancias es posible medir la capacidad individual de cada célula para expulsar medicamentos sustratos de dichos transportadores⁴⁸. Así, porcentajes tan bajos como un 3% de células expulsoras, bien sea de daunorubicina o mitoxantrona, pudieran ser responsables de condicionar un estado de resistencia a los medicamentos relacionados con tales transportadores (o bien reflejar actividad o exacerbación de la enfermedad). Interesantemente, existen varios inhibidores, en particular de la P-gp, capaces de revertir el fenotipo de resistencia⁴⁹; si bien éstos se han empleado en neoplasias, pudieramos argumentar un beneficio terapéutico (toda vez que se agreguen a los tratamientos empleados) como optimizadores de la acción farmacológica de los FMDE (toda vez que sean sustratos de los transportadores aquí descritos).

En suma, nuestros resultados muestran que los pacientes con AR activa presentan mayor actividad funcional de los transportadores P-gp y BCRP1 en comparación con los pacientes en remisión. La AE se correlaciona positivamente con la actividad de los transportadores, de manera puntual y a los seis meses de seguimiento. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio en la literatura que valora concomitantemente la función de los transportadores P-gp y BCRP1 en AR. A pesar de nuestros datos preliminares, pareciera concluyente que, en pacientes con AR, el comportamiento de la P-gp y la BCRP1 está condicionado por la AE.

Bibliografía

- Godia K, Bacsó Z, Szabó G. Multidrug resistance through the spectacle of P-glycoprotein. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9:281-9.
- Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, et al. The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;141:956-62.
- Litman T, Druley TE, Stein WD, et al. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:931-59.
- Mohri H, Markowitz M. In vitro characterization of multidrug-resistant HIV-1 isolates from a recently infected patient associated with dual tropism and rapid disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48:511-21.
- Jansen G, Schepers RJ, Dijkmans BA. Multidrug resistance proteins in rheumatoid arthritis, role in disease-modifying antirheumatic drug efficacy and inflammatory processes: an overview. *Scand J Rheumatol*. 2003;32:325-36.

6. Fleming A, Benn RT, Corbert M, Wood PH. Early rheumatoid disease. II. Patterns of joint involvement. *Ann Rheum Dis.* 1976;35:361-4.
7. Emery P, Salmon M. Early rheumatoid arthritis: to aim for remission? *Ann Rheum Dis.* 1995;54:944-7.
8. Paulus HE. Defining remission in rheumatoid arthritis: what is it? Does it matter? *J Rheumatol.* 2004;31:1-4.
9. O'Dell JR. Treatment of Rheumatoid Arthritis. En: Imboden JB, Hellmann DB, Stone JH, editores. *Current Rheumatology Diagnosis & Treatment.* Nueva York: McGraw-Hill Inc; 2007. p. 170-4.
10. Pérez-Ballestas I, Sanín LH, Moreno-Montoya J, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl.* 2011;86:3-8.
11. Mody GM, Cardiel MH. Challenges in the management of rheumatoid arthritis in developing countries. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008; 22:621-41.
12. van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: A prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004;50:709-15.
13. Möttönen T, Hannonen P, Korpela M, et al. Delay of institution of therapy or induction of remission using single drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:894-8.
14. Nell VPK, Machold KP, Eberl G. Benefit of very early referral therapy with disease modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2004;43:906-14.
15. Welsing PM, van Gestel AM, Swinkels HL, Kiemeneij LA, van Riel PL. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2009-17.
16. Paulus HE, van der Heijde DM, Bulpitt KJ, Gold RH. Monitoring radiographic changes in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1996;23:16-24.
17. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2010;69: 1580-8.
18. Coopere NJ. Economic burden of rheumatoid arthritis: A systematic review. *Rheumatology.* 2000;39:28-33.
19. Young A, Dixey J, Kulinskaya E, et al. Which patients with early arthritis stop working? Results of five years' follow up in 732 patients from the Early RA Study (ERAS). *Ann Rheum Dis.* 2002;61:335-40.
20. Cardiel MH, Díaz-Borjón A, Vázquez del Mercado Espinosa M, et al. Actualización en la guía mexicana para el tratamiento farmacológico de la artritis reumatoide del colegio mexicano de reumatología. *Reumatol Clin.* 2014;10:227-40.
21. Haraoui B. The anti-tumor necrosis factor agents are a major advance in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005;72:46-7.
22. Llorente L, Richaud-Patin Y, Díaz-Borjón A, et al. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. *Joint Bone Spine.* 2000;67:30-9.
23. Mailefert JF, Maynadie M, Tebib JG, et al. Expression of the multidrug resistance glycoprotein 170 in the peripheral blood lymphocytes of rheumatoid arthritis patients. The percentage of lymphocytes expressing glycoprotein 170 is increased in patients treated with prednisolone. *Br J Rheumatol.* 1996;35:430-5.
24. Jorgensen C, Sun R, Rossi JF, et al. Expression of multidrug resistance gene in human rheumatoid synovium. *Rheumatol Int.* 1995;15:83-6.
25. Borowski LC, Lopes RP, González TP, et al. Is steroid resistance related to multidrug resistance-I (MDR-I) in rheumatoid arthritis? *Int Immunopharmacol.* 2007;7:836-44.
26. Wolf J, Stranzl T, Filipits M, et al. Expression of resistance markers to methotrexate predicts clinical improvement in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:564-8.
27. Hider SL, Owen A, Hartkorn R, et al. Down regulation of multidrug resistance protein-1 expression in patients with early rheumatoid arthritis exposed to methotrexate as a first disease-modifying antirheumatic drug. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:1390-3.
28. Furst DE. Acquired resistance of human T cells to sulfasalazine. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:115-6.
29. Van der Heijden J, de Jong MC, Dijkmans BAC, et al. Acquires resistance of human T cells to sulfasalazine: stability of the resistant phenotype and sensitivity to non-related DMARDs. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63:131-7.
30. Van der Heijden J, de Jong MC, Dijkmans BAC, et al. Development of sulfasalazine resistance in human T cells induces expression of the multidrug resistance transporter ABCG2 (BCRP) and augmented production of TNF alpha. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:138-43.
31. Pascual-Ramos V, Contreras-Yáñez I, Villa-Moreno AR, Cabiedes-Contreras J, Rull-Gabayet M. Medication persistence over 2-years follow-up in a cohort of early rheumatoid arthritis patients: associated factors and relationship with disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R26.
32. Estrada J, Pascual-Ramos V, Martínez B, Uribe M, Torre A. Autoimmune hepatitis with giant-cell transformation. Case report. *Ann of Hepatol.* 2009;8:68-70.
33. Pascual-Ramos V, Contreras-Yáñez I, Rull-Gabayet M, Villa AR, Vázquez-Lamadrid J, Mendoza-Ruiz JJ. Hypervascular sinovitis and American College of Rheumatology classification criteria as predictors of radiographic damage in early rheumatoid arthritis. *USQ.* 2009;25:31-8.
34. Contreras-Yáñez I, Ponce de León S, Cabiedes J, Rull-Gabayet M, Pascual-Ramos V. Inadequate therapy behavior is associated to disease flares in patients with rheumatoid arthritis who have achieved remission with disease modifying anti-rheumatic drugs. *Am J Med Sci.* 2010;340: 282-90.
35. Contreras-Yáñez I, Cabiedes J, Villa AR, Rull-Gabayet M, Pascual-Ramos V. Persistence on therapy is a major determinant of patient-, physician- and laboratory-reported outcomes in recent onset rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28:748-51.
36. Contreras-Yáñez I, Rull-Gabayet M, Vázquez-Lamadrid J, Pascual-Ramos V. Radiographic outcome in Hispanic early rheumatoid arthritis patients treated with conventional disease modifying anti-rheumatic drugs. *Eur J Radiol.* 2011;79:52-7.
37. Contreras-Yáñez I, Rull-Gabayet M, Pascual-Ramos V. Early disease activity suppression and younger age predict excellent outcome of recent-onset rheumatoid arthritis patients with conventional disease modifying anti-rheumatic drugs. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:402-8.
38. Pascual-Ramos V, Contreras-Yáñez I. Motivations for inadequate persistence with disease modifying anti-rheumatic drugs. The patient's perspective. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:336.
39. Sánchez T, Elías-López D, Contreras-Yáñez I, Aguilar-Salinas C, Pascual-Ramos V. Prevalence of lipid phenotypes, serum lipid's behavior over follow-up and predictors of serum lipid levels in a cohort of Mexican Mestizo early rheumatoid arthritis (RA) patients treated with conventional DMARDs. *Clin Exp Rheumatol.* 2014;32:509-15.
40. Parra-Salcedo F, Contreras-Yáñez I, Elías-López D, Aguilar-Salinas A, Pascual-Ramos V. Prevalence, incidence and characteristics of the Metabolic Syndrome (MetS) in a cohort of Mexican Mestizo early rheumatoid arthritis (RA) patients treated with conventional disease modifying anti-rheumatic drugs. The complex relationship between MetS and disease activity. *Arthritis Res Ther.* En prensa 2015.
41. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-24.
42. Prevoo ML. Modified disease activity scores that include twenty-eight joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:44-8.
43. Van de Ven R, Oerlemans R, van der Heijden JW, et al. ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer. *J Leuk Biol.* 2009;86:1075-9.
44. Márki-Zay J, Jakab T, Szerémy P, Krajczi P. MDR-ABC transporters: biomarkers in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2013;31:779-87.
45. Machold KP, Stamm TA, Neil VPK, et al. Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatol.* 2007;46:342-9.
46. Kroon EJJ, de Wong BAW, van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1831-5.
47. Yudoh K, Matsumoto H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Increased expression of multidrug resistance of P-glycoprotein on Th1 cells correlates with drug resistance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2014-5.
48. Kappler Mayer J, Karazi E, Telek B, Jakab K. "Pros and cons" on how to measure multidrug resistance in leukemias. *Leuk Lymphoma.* 2002;43: 711-7.
49. Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem.* 2012;19:1946-205.