

TESIS DOCTORAL:

AFECCION HEPATICA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE Y HEPATOTOXICIDAD
DEL METOTREXATE. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA.

DOCTORANDO: SERGIO ROS EXPOSITO

Servicio de Reumatología de la Ciutat Sanitària i Universitària
de Bellvitge.

Tesis dirigida por el Dr. Daniel Roig Escofet

INDICE

Agradecimientos

I. INTRODUCCION

II. ARTRITIS REUMATOIDE

III. TEJIDO HEPATICO

III.1 Histología

III.2 Afección hepática en la artritis reumatoide

IV. METOTREXATE

V. TOXICIDAD HEPATICA DEL METOTREXATE

V.1 Microscopia óptica

V.2 Microscopia electrónica

VI. FACTORES DE RIESGO DE TOXICIDAD POR METOTREXATE. CRITERIOS DE REALIZACION DE BIOPSIA HEPATICA.

VII. HIPOTESIS DE TRABAJO

VIII. DEFINICION DE OBJETIVOS

VIII.1 Objetivos principales

VIII.2 Objetivos secundarios

IX. MATERIAL Y METODO

X. RESULTADOS

- X.1 Estudio descriptivo de los pacientes
- X.2 Estudio descriptivo de los hallazgos histológicos observados en las primeras biopsias hepáticas
 - X.2.1 Estudio mediante microscopia óptica
 - X.2.2 Estudio mediante microscopia electrónica
- X.3 Estudio descriptivo de los hallazgos histológicos observados en las segundas biopsias hepáticas
 - X.3.1 Estudio mediante microscopia óptica
 - X.3.2 Estudio mediante microscopia electrónica
- X.4 Estudio comparativo entre los datos clínicos, analíticos e histológicos obtenidos en el momento de las primeras y las segundas biopsias hepáticas
- X.5 Estudio de correlación entre los resultados observados mediante microscopia óptica y microscopia electrónica
- X.6 Estudio de los factores de riesgo de toxicidad hepática por metotrexate
 - X.6.1 Estudio de regresión múltiple
 - X.6.2 Estudio de regresión logística

XI. DISCUSION

XII. CONCLUSIONES

XIII. BIBLIOGRAFIA

AGRADECIMIENTOS

Cuando se lleva a cabo la tesis doctoral, normalmente se realiza como actividad extralaboral y ello significa menos dedicación y atención a la familia. Es por ello que quiero expresarle mi agradecimiento en primer lugar.

En especial a mi mujer, por su comprensión, inestimable ayuda y constante estímulo que me han ayudado a finalizar este trayecto cuya meta era la tesis.

A mis padres que me estimularon siempre a superarme. Al resto de la familia y amigos que con tanta paciencia me han soportado durante todo este tiempo.

Esta tesis representa el fruto de varios años en la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge (CSUB). Para llevar a cabo una tarea de estas características es preciso la colaboración de un equipo:

- Mi agradecimiento al Dr. Condom del Servicio de Biología celular y Anatomía patológica, a la Dra. Cañas del de Radiodiagnóstico, al Dr. Guardiola del de Gastroenterología y al Dr. Riera del de Bioquímica médica. También mi agradecimiento al Dr. Rebas por su ayuda en la realización del estudio estadístico.

- Mi agradecimiento a la Sociedad Catalana de Reumatología por la concesión de su beca del año 1996.
- Especial mención a todos los miembros del Servicio de Reumatología de la CSUB y entre ellos al Dr. Xavi Juanola, amigo y compañero, por su inestimable ayuda y apoyo constante en la realización de este trabajo.

Con la alegría de llegar a la recta final, deseo dejar constancia de mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que de una forma u otra han ayudado a que esto fuera realidad.

Por último, expresar mi admiración a mi director de tesis, el Dr. Daniel Roig Escofet, por su intensa labor de colaboración, asesoramiento y aliento en el desarrollo del trabajo experimental. Puedo estar orgulloso de haber tenido un excelente jefe de Servicio y un verdadero director de tesis.

I. INTRODUCCION

En 1951, Gubner y colaboradores administraron por primera vez aminopterina a seis pacientes con artritis reumatoide observando una importante mejoría de los síntomas articulares (1). Desde los años 70 otros autores han demostrado la eficacia del metotrexate en el tratamiento de esta enfermedad pero no fue hasta el año 1988 cuando la Administración de alimentación y medicamentos de los EEUU aprobó su utilización en el tratamiento de la artritis reumatoide. Desde entonces, este fármaco se ha consolidado como el "antirreumático de segunda línea" de elección en el tratamiento de la mayoría de los pacientes afectos de artritis reumatoide. El metotrexate se ha mostrado efectivo en el tratamiento de esta enfermedad, pero entre sus acciones adversas destaca la posible toxicidad hepática. La hepatopatía puede permanecer asintomática durante años y cabe la posibilidad de que, cuando se manifieste, la alteración sea irreversible.

La gran mayoría de los estudios realizados hasta ahora han tenido como base los exámenes bioquímicos y el análisis mediante microscopia óptica de las biopsias hepáticas realizadas a los pacientes afectos de artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate. Es posible que la microscopia electrónica ofrezca

una mayor información y permita objetivar más precozmente la posible hepatopatía. Por otra parte, también existe la posibilidad de que esta técnica sea capaz de diferenciar la lesión hepática por metotrexate de la producida por otras causas o por la propia enfermedad, problema éste no resuelto en los estudios anteriormente realizados.

La hepatopatía no figura entre las manifestaciones de la artritis reumatoide. No obstante, en 1982 Spooner y colaboradores (2) ya observaron que un grupo de pacientes con artritis reumatoide presentaban alteraciones de las enzimas hepáticas en algún momento de la evolución de su enfermedad. Estudios posteriores, que han incluido la práctica de exámenes de tejido hepático obtenido mediante punción biopsia, han demostrado la existencia de alteraciones histológicas en algunos casos.

El estudio de la posible hepatopatía propia de la artritis reumatoide y la diferenciación entre ésta y la provocada por el metotrexate constituyen aspectos de gran importancia práctica, dada la gran frecuencia y trascendencia médica y sanitaria de esta enfermedad.

II. ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide es una enfermedad multisistémica. Su principal manifestación clínica es la afección poliarticular, inflamatoria, no supurada, con tendencia a la simetría y con predominio en las pequeñas articulaciones de las manos y de los pies.

Es la enfermedad articular crónica inflamatoria más frecuente, afectando alrededor del 1% de la población. Predomina en el sexo femenino (3:1) con una máxima incidencia entre los 40-60 años de edad.

Su etiología es desconocida aunque se considera que existe la acción de un antígeno, exógeno o autoantígeno, en un individuo con una base genética adecuada. Así pues, un antígeno desconocido provoca en un individuo predispuesto genéticamente una respuesta inmune que condiciona la aparición de una reacción inflamatoria.

Desde el punto de vista histológico, la lesión inicial se localiza en la membrana sinovial. La membrana sinovial se engrosa y edematiza adhiriéndose a los bordes del cartílago hialino y transformándose en un tejido de granulación denominado pannus. Dicho tejido de granulación destruye progresivamente el cartílago articular y el hueso subcondral facilitando la

aparición de desviaciones y luxaciones.

A pesar de que su principal manifestación clínica es la artritis, puede afectarse cualquier órgano o sistema. Las manifestaciones extraarticulares más frecuentes son:

- bursitis y tenosinovitis,
- nódulos reumatoides,
- vasculitis,
- manifestaciones pleuropulmonares: pleuritis, fibrosis intersticial, bronquiolitis obliterante, nódulos pulmonares e hipertensión pulmonar,
- manifestaciones cardíacas: nódulos, serositis, aterosclerosis,
- alteraciones neurológicas: por compresión o por vasculitis de los vasa nervorum,
- manifestaciones oculares: epiescleritis, escleritis, queratoconjuntivitis seca,

Además, existen dos complicaciones graves: las infecciones articulares y la amiloidosis.

La existencia de manifestaciones extraarticulares, la positividad del factor reumatoide y la existencia de erosiones articulares tempranas son factores de un peor pronóstico. El comienzo agudo y las remisiones periódicas implican un mejor pronóstico.

El diagnóstico se realiza mediante los criterios establecidos por el American College of Rheumatology en 1988 (3), siendo necesario el cumplimiento de cuatro de los siguientes criterios:

- 1/.rigidez matutina superior a una hora, presente durante al menos 6 semanas.
- 2/.inflamación de 3 ó más articulaciones con una duración superior a las 6 semanas.
- 3/.inflamación de la muñeca, articulaciones metacarpofalángicas o interfalángicas proximales durante al menos semanas.
- 4/.inflamación articular con carácter simétrico.
- 5/.cambios radiológicos típicos de artritis reumatoide en las manos: erosiones u osteoporosis yuxtaarticular indudable.
- 6/.nódulos reumatoides.
- 7/.factor reumatoide, detectado por un método que resulte positivo en menos del 5% de la población normal.

El tratamiento podemos dividirlo en cuatro grandes apartados:

-una correcta información del paciente sobre la naturaleza de la enfermedad, los objetivos del tratamiento y la necesidad de su colaboración.

- el tratamiento médico, que consiste en la combinación de antiinflamatorios no esteroideos y "antirreumáticos de segunda línea" (preferentemente metotrexate). En ocasiones, son necesarias dosis bajas de glucocorticoides (5 mg de prednisona o equivalentes) o tratamientos médicos más agresivos en las formas más graves o con complicaciones.
- algunos tratamientos quirúrgicos, en especial la colocación de prótesis en estadios avanzados de daño articular.
- seguimiento de un programa básico de fisioterapia y rehabilitación.

III. TEJIDO HEPATICO

III.1. HISTOLOGIA

El hígado es la glándula más voluminosa del cuerpo humano; supone aproximadamente el 1/50 del peso corporal en el adulto.

El 80% de la población celular del hígado está constituida por los hepatocitos (células parenquimatosas) que se ordenan en láminas formadas por grandes células poliédricas. Dichas células contienen en su interior retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas y mitocondrias (4).

La unidad estructural del órgano es el lobulillo hepático, un prisma poliédrico de tejido que contiene placas unidas de células parenquimatosas y un sistema de sinusoides sanguíneos. Las ramas de los vasos sanguíneos aferentes y de los conductos hepáticos corren a lo largo de los bordes del poliedro (canales portales), y la vena central pasa por el centro de éste.

El hígado tiene un doble sistema de irrigación sanguínea:

-la vena porta, que transporta sangre procedente del tubo digestivo, bazo y páncreas. Suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al hígado. Esta sangre es rica en nutrientes pero pobre en oxígeno.

-la arteria hepática, rama del tronco celiaco, que transporta sangre bien oxigenada y constituye el 25% restante del aporte sanguíneo al hígado.

La sangre de las ramas de estos dos vasos llega a través de los canales portales hasta los sinusoides; aquí se mezcla y fluye hacia el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central. Al abandonar los lobulillos, las venas centrales se unen formando las venas sublobulillares, que finalmente se unen constituyendo las venas hepáticas. La sangre vuelve al corazón a través de la vena cava inferior.

La bilis producida por las células parenquimatosas es secretada en el interior de diminutos canalículos biliares. En la periferia del lobulillo, la bilis fluye hacia pequeños conductillos hepáticos (canales de Hering) y posteriormente hasta los canales portales donde ramificaciones de los conductos biliares la conducen hasta los conductos biliares derecho o izquierdo. Estos dos conductos se unen en el hilio para formar el conducto hepático propiamente dicho. Poco después de salir del hígado, el conducto hepático se une con el conducto cístico (procedente de la vesícula biliar) para formar el conducto colédoco que desemboca en el duodeno.

Existen dos conceptos que es importante tener claros para el mejor entendimiento de los hallazgos histológicos observados en las biopsias hepáticas:

-el espacio Disse o perisinusoidal se encuentra entre los sinusoides y los hepatocitos. Contiene pequeñas cantidades de fibroblastos, células de Kupffer (macrófagos hepáticos) y lipocitos o células de Ito (intervienen en el metabolismo de la vitamina A y en la producción de fibroblastos).

-el tejido conectivo existente en el hígado es escaso. El exceso de dicho tejido se denomina fibrosis hepática.

La fibrosis hepática puede iniciarse en los canales portales, alrededor de las venas centrales, alrededor de los hepatocitos y alrededor de los conductillos hepáticos.

La lesión del hepatocito condiciona un aumento de fibroblastos y con ellos de fibras de colágeno alrededor del hepatocito. Todo ello dificulta la nutrición de la célula con lo que aparece la necrosis seguida de la sustitución de la célula por tejido fibrótico.

En 1988, Roenigk y colaboradores publicaron los que actualmente se consideran grados anatomopatológicos de lesión hepática o estadios de Roenigk (5). Dichos estadios son los siguientes:

-estadio I: histología normal.

-estadio II: infiltración grasa, inflamación periportal y necrosis celular moderada-severa.

-estadio IIIA: fibrosis hepática leve.

-estadio IIIB: fibrosis hepática moderada-severa.

-estadio IV: cirrosis hepática.

III.2. AFECCION HEPATICA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

La bibliografía existente sobre la afección hepática en esta enfermedad es escasa. En los dos tratados clásicos de reumatología, el "Textbook of Rheumatology" de Kelley WN y colaboradores (6) y el "Arthritis and allied conditions" de Mc Carty DJ y colaboradores (7), no se cita la afección hepática entre las manifestaciones extraarticulares de la artritis reumatoide.

En 1982, Spooner y colaboradores (2) publican que entre el 25-50% de los pacientes afectos de artritis reumatoide presentan alteraciones de las enzimas hepáticas en algún momento de la evolución de su enfermedad. Estas alteraciones suelen consistir sobre todo en un aumento de la gammaglutamiltransferasa y de las fosfatasas alcalinas.

Martin y colaboradores (8), en una revisión publicada en 1987, consideran que dichas alteraciones enzimáticas pueden ser consecuencia de:

- toxicidad medicamentosa: antiinflamatorios no esteroideos, antirreumáticos de segunda línea,
- patología ajena a la enfermedad: hepatitis alcohólica, hepatitis vírica,

-patología relacionada con la enfermedad: síndrome de Sjögren secundario, cirrosis biliar primaria, amiloidosis, hiperplasia nodular regenerativa,
-la propia artritis reumatoide.

Los estudios anatomopatológicos también son escasos. La mayoría de ellos se han realizado en pacientes afectados de artritis reumatoide con alteraciones en la bioquímica hepática. El estudio de las biopsias hepáticas de estos pacientes mediante microscopia óptica pone de manifiesto la existencia de alteraciones inespecíficas consistentes en hiperplasia de las células de Kupffer, infiltración de las regiones periportales por células mononucleadas y sobre todo dilatación sinusoidal. Estos hallazgos histológicos también han sido observados en biopsias hepáticas realizadas a pacientes afectados de artritis reumatoide sin alteraciones en la bioquímica hepática (9).

Ruderman y colaboradores (10) publicaron en 1997 un estudio retrospectivo que analizaba los datos histológicos hepáticos de 188 autopsias realizadas entre los años 1958-1985 a pacientes afectados de artritis reumatoide antes de la generalización del uso del metotrexate en el tratamiento de esta enfermedad. Observaron 15 casos de fibrosis hepática difusa, dos de ellos severa (estadio IIIB de Roenigk). En estos dos últimos casos las

posibles causas de muerte habían sido el abuso del alcohol y una hepatitis viral. Concluyeron que la incidencia de fibrosis hepática observada en los pacientes con artritis reumatoide de su serie fue del 8%, si bien la fibrosis hepática severa era rara. Además, aconsejaban la realización de biopsias hepáticas a los pacientes con artritis reumatoide en los que se sospechara patología hepática antes de iniciar el tratamiento con metotrexate.

Únicamente hemos encontrado una publicación, en la bibliografía revisada (MEDLINE 1980-1999), en la que se empleaba la microscopia electrónica para el estudio de la afección hepática en pacientes con artritis reumatoide y alteraciones en su bioquímica hepática; en ella, Mills y colaboradores (11) observaron como hallazgo más significativo un aumento del volumen del retículo endoplasmático liso en 4 de los 31 pacientes biopsiados (13%).

Así pues está aceptado que la artritis reumatoide no tratada con metotrexate se acompaña de alteraciones histológicas en el tejido hepático.

IV. METOTREXATE

El metotrexate se ha convertido en el fármaco de elección como "antirreumático de segunda línea" en el tratamiento de los pacientes afectos de artritis reumatoide.

Se absorbe por vía oral, intramuscular, endovenosa y subcutánea. Su biodisponibilidad es similar con cualquiera de estas vías de administración. Después de su absorción, circula en sangre periférica unido a proteínas (12).

En el hígado se transforma en su metabolito activo, el 7-hidroximetotrexate, que también se une a proteínas. Tanto el metotrexate como su metabolito activo son poliglutamatos por lo que difunden a través de las membranas con gran facilidad. Así, la relación entre la concentración sérica y la concentración en el líquido sinovial de metotrexate es aproximadamente la unidad (12).

Su vida media es corta, 7-10 horas. Sin embargo, el hecho de ser un poliglutamato le confiere la capacidad de acumularse en los tejidos por lo que su administración suele ser en forma de una dosis semanal. Su eliminación es renal mediante filtración y secreción en el túbulo proximal. Además, algunos estudios han demostrado la existencia de circulación enterohepática del metotrexate (13).

Su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima dihidrofólico reductasa. A dosis elevadas, utilizadas en tratamientos oncológicos, interfiere en la síntesis de las purinas y, a dosis medias o bajas, utilizadas en tratamientos reumatológicos, actúa como inmunosupresor y/o antiinflamatorio sobre los linfocitos B, linfocitos T y sobretodo los polimorfonucleares. También actúa sobre la interleuquina-1, la interleuquina-2 y la interleuquina-6.

Las interacciones del metotrexate se producen con aquellos fármacos que interfieren su absorción, circulación, metabolismo o eliminación.

Los antiinflamatorios no esteroideos constituyen un grupo farmacológico importante por su frecuente uso concomitante con el metotrexate en el tratamiento de los pacientes con artritis reumatoide.

En 1992, Rabinovitz y colaboradores (14) realizan una revisión de la bibliografía existente en torno a la toxicidad hepática de los antiinflamatorios no esteroideos. En dicha revisión identifican los tipos y la severidad de las reacciones adversas de la mayoría de estos fármacos. Los más hepatotóxicos son el acetaminofen, el diclofenaco, el sulindac y la fenilbutazona. Los menos hepatotóxicos son el ibuprofeno, el ketoprofeno y la

indometacina. Existe algún caso descrito de hepatitis fulminante por antiinflamatorios no esteroideos que motivó la retirada del mercado del fármaco.

La elevación de la cifra de transaminasas es la alteración más frecuente y suele solucionarse con la disminución de la dosis.

El riesgo de toxicidad hepática por antiinflamatorios no esteroideos aumenta con la utilización de dosis elevadas o durante períodos prolongados de tiempo, en los pacientes de edad avanzada o con disminución de la función renal o con uso concomitante de otros fármacos, así como en los enfermos afectos de artritis crónica juvenil, de artropatía psoriásica o de lupus eritematoso sistémico.

V. TOXICIDAD HEPATICA DEL METOTREXATE

La toxicidad hepática del metotrexate se ha observado durante el tratamiento de pacientes afectados por diferentes hemopatías, por artropatía psoriásica (15-17) y con menor frecuencia por artritis reumatoide.

En 1986, Kremer y colaboradores (18) demostraron un déficit de la cantidad de folatos y un aumento de poliglutamatos de metotrexate en las biopsias hepáticas de pacientes con artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate.

En 1991, Ahern y colaboradores (19) estudiaron las biopsias hepáticas de 16 pacientes afectados de artritis reumatoide que seguían tratamiento con metotrexate. Observaron que los tres pacientes que tenían un mayor grado de fibrosis en sus biopsias hepáticas presentaban un marcado incremento del contenido de metotrexate y de sus poliglutamatos en las muestras. Estos datos apuntaban a que el mecanismo de toxicidad del metotrexate en el hígado era su acumulación y con ella la disminución de los niveles de ácido fólico en dicho tejido.

V.1. MICROSCOPIA OPTICA

La gran mayoría de los estudios existentes sobre la afección hepática del metotrexate en los pacientes afectos de artritis reumatoide utilizan la microscopia óptica para analizar las biopsias hepáticas. Los hallazgos histológicos observados en estos estudios son inespecíficos (18,20-26).

En 1989, Brick y colaboradores en una revisión realizada sobre un total de 625 pacientes afectos de artritis reumatoide que seguían tratamiento con metotrexate encontraron una incidencia de fibrosis en las biopsias hepáticas del 11% de los pacientes, incluyendo 3 de los 69 pacientes de su serie (21).

Kremer JM y su grupo de trabajo son los que desde 1986 se han ocupado con mayor dedicación al estudio de la toxicidad hepática del metotrexate en los pacientes afectos de artritis reumatoide (18,23,27-29). En 1989, publicaron su serie de 22 pacientes tras un seguimiento de 6 años. Se estudiaron 52 biopsias hepáticas. Sólo en el 9% de los pacientes (2 de los 22) se objetivó un incremento de los depósitos de colágeno en sus biopsias hepáticas seriadas (27).

En 1992, Phillips CA y colaboradores (20) publicaron un estudio prospectivo que incluía 134 pacientes afectos de artritis reumatoide y en tratamiento con dosis bajas de metotrexate

seguidos durante 8 años. Se estudiaron 119 biopsias hepáticas de las que 2 presentaron fibrosis hepática severa (estadio IIIB de Roenigk) y 1 cirrosis hepática (estadio IV de Roenigk). Así pues, la incidencia de afección hepática severa en las biopsias estudiadas fue inferior al 3%.

En 1994 un subcomité constituido con el objetivo de sugerir unas directrices para la monitorización de la toxicidad hepática del metotrexate en los pacientes afectados de artritis reumatoide, revisó diversos estudios teniendo especial interés en datos como la frecuencia de elevación de los parámetros bioquímicos hepáticos, su correlación con los datos anatomopatológicos y el grado de severidad de estas alteraciones (26).

Se revisaron diferentes estudios prospectivos a doble ciego, protocolos controlados y ensayos clínicos abiertos. Se incluyeron 637 pacientes afectados de artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate durante más de 36 semanas y se compararon con 143 pacientes en tratamiento con auranofin durante 36 semanas y 51 pacientes que recibían tratamiento placebo durante un máximo de 120 días. A todos ellos se les realizaban controles analíticos con una periodicidad mensual. Llegaron a las siguientes conclusiones:

-los niveles séricos de fosfatasas alcalinas, AST y ALT eran más elevados de forma estadísticamente significativa en los

pacientes afectados de artritis reumatoide que seguían tratamiento con metotrexate que en los pacientes que seguían tratamiento con auranofin o con placebo.

-estas anormalidades eran más frecuentes durante los primeros 2 años de tratamiento, disminuyendo posteriormente.

-el parámetro más sensible fue la elevación de las fosfatasas alcalinas, observada en el 31% de las determinaciones frente al 2% de la población normal. Las ALT resultaron elevadas en el 12% de las determinaciones y las AST en el 8% de las mismas.

-las alteraciones analíticas que más se correlacionaron con la histología hepática fueron la elevación de las AST y la disminución de la albúmina.

-en todos los estudios se observaba una mejoría de los parámetros analíticos con pequeñas disminuciones en la dosis de metotrexate.

En cuanto a la severidad histológica y tras realizar una revisión de 719 pacientes incluidos en 15 estudios encontraron:

-dos casos de cirrosis hepática (estadio IV). En uno de ellos no se disponía de biopsia previa al inicio del tratamiento con metotrexate y en el otro, tras revisar la biopsia previa se observó que ya existía cirrosis hepática antes de iniciar el tratamiento con metotrexate.

-seis casos de fibrosis hepática severa (estadio IIIB). Sólo en uno de ellos se disponía de biopsia hepática previa al inicio del tratamiento con metotrexate (30).

-103 casos (14%) de fibrosis hepática leve-media (estadio IIIA). En tres de los cuatro casos en los que se disponía de biopsia previa se demostró la existencia de este grado de fibrosis antes de iniciar el tratamiento con metotrexate (27).

Sin embargo, los autores de esta revisión reconocen la existencia de cambios histológicos similares en las biopsias hepáticas de pacientes con artritis reumatoide tratados con metotrexate y en las de los que no siguen este tratamiento.

En 1995, Kremer y colaboradores (28) realizaron un estudio prospectivo donde se incluían 27 pacientes a los que se les realizaba una media de 6,3 biopsias hepáticas a cada uno en un período de seguimiento de 8,2 años. Entre otras conclusiones, observaron que pequeñas variaciones en la dosis de metotrexate ocasionaban una mejoría de los hallazgos anatomopatológicos.

En un estudio posterior y después de realizar el análisis histológico de 354 biopsias hepáticas realizadas a 94 pacientes, Kremer y colaboradores (29) confirman la existencia de una correlación entre los niveles plasmáticos de AST y los resultados histológicos observados mediante microscopia óptica.

Concluyen que la determinación regular de los niveles plasmáticos de AST es útil como marcador de la situación hepática en los pacientes afectos de artritis reumatoide que siguen tratamiento con metotrexate.

V.2. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Los estudios que emplean la microscopia electrónica para el estudio de las biopsias hepáticas son muy escasos. Existen dos grupos de trabajo; el de Bjorkman y colaboradores (31,32) y el de Kremer y colaboradores (27,28).

El grupo de Bjorkman destacó la existencia de fibras de colágeno en el espacio perisinusoidal (espacio Disse) y un aumento del número y tamaño de los lisosomas en las biopsias hepáticas de la mayoría de los pacientes afectos de artritis reumatoide que seguían tratamiento con metotrexate. Sin embargo, no pudieron atribuir definitivamente estos hallazgos histológicos al metotrexate por carecer de biopsias hepáticas de estos pacientes anteriores al inicio del tratamiento. Además, este mismo grupo de trabajo atribuyó una mayor sensibilidad a la microscopia electrónica frente a la óptica al demostrar la primera la existencia de un incremento de las fibras de colágeno en los sinusoides hepáticos que no había sido detectado mediante microscopia óptica.

Kremer y su grupo discrepan de los resultados de Bjorkman tras el estudio de 48 biopsias hepáticas realizadas a 22 pacientes afectos de artritis reumatoide seguidos durante 6 años de tratamiento con metotrexate. Encontraron fibras de colágeno en

los espacios Disse de biopsias hepáticas realizadas a pacientes afectados de artritis reumatoide que nunca habían seguido tratamiento con metotrexate y no objetivaron de forma estadísticamente significativa un incremento del número y tamaño de los lisosomas en las biopsias hepáticas de pacientes con artritis reumatoide que seguían tratamiento con metotrexate. Sin embargo, observaron un descenso estadísticamente significativo del retículo endoplasmático liso (27).

En un estudio posterior, concluyeron que el análisis de las biopsias hepáticas de estos pacientes mediante microscopia electrónica únicamente confirmaba la naturaleza benigna de los hallazgos observados en dichas biopsias mediante microscopia óptica (28).

VI. FACTORES DE RIESGO DE TOXICIDAD POR METOTREXATE.

CRITERIOS DE REALIZACION DE BIOPSIA HEPATICA.

La mayoría de los estudios existentes en torno a los factores de riesgo de toxicidad hepática por metotrexate están realizados en pacientes con artropatía psoriásica y sus resultados se han extrapolado a los pacientes con artritis reumatoide. Su objetivo es detectar aquellos pacientes que tienen un riesgo más elevado de padecer toxicidad hepática por metotrexate y que, por tanto, serían tributarios de realización de biopsia hepática en el seguimiento del tratamiento.

Los primeros estudios encaminados a localizar los factores de riesgo de toxicidad hepática por metotrexate y las indicaciones de realización de biopsia hepática en los pacientes que siguen dicho tratamiento aparecen en los años 80. Como he señalado anteriormente, la mayoría de ellos incluyen series de pacientes afectados de artropatía psoriásica.

Uno de los parámetros estudiados como posible marcador de fibrosis hepática es el péptido aminoterminal del procolágeno tipo III (P-III-P). El tejido conectivo hepático contiene principalmente colágeno tipo I y tipo III. La proliferación del tejido conectivo en el hígado (fibrosis) se asocia con un incremento de la concentración sérica de P-III-P. Este hecho ha

sido demostrado en los pacientes afectados de fibrosis hepática de origen alcohólico y viral. Sin embargo, también se ha asociado a patologías como la fibrosis pulmonar, la acromegalia y la enfermedad de Paget.

En 1988, Risteli y colaboradores (33) determinaron los niveles séricos de P-III-P en una serie de 24 pacientes afectados de artropatía psoriásica que seguían tratamiento con metotrexate con el objetivo de valorar su utilidad como marcador de fibrosis hepática. Concluyeron que a pesar de que este análisis no era específico de fibrosis hepática, los pacientes con niveles de P-III-P normales en sangre periférica no eran tributarios de realización de biopsia hepática.

Boffa y colaboradores (34), en 1996 publicaron una serie de 87 pacientes afectados de artropatía psoriásica que recibían tratamiento con metotrexate a los que se les determinaron los niveles séricos de P-III-P y LamP1 en el momento de la realización de la biopsia hepática. Concluyeron que la determinación sérica de los niveles de P-III-P era un buen marcador de toxicidad hepática y reduciría la necesidad de realización de biopsias hepáticas en estos pacientes. Sin embargo, observaron que existe un pequeño grupo de pacientes con niveles plasmáticos de P-III-P normales y fibrosis hepática.

En la artritis reumatoide, algunos autores como Bridges y colaboradores sugerían la no necesidad de realizar biopsias hepáticas a los pacientes en tratamiento con metotrexate (35). En cambio, Kremer (23) y Furst (36) recomendaban la realización de una biopsia hepática de forma rutinaria cada 1500-2500 mg de dosis acumulada de metotrexate.

En 1991, Whiting-O'Keefe y colaboradores (22), con la finalidad de establecer unos criterios de realización de biopsia hepática a los pacientes en tratamiento con metotrexate realizaron un meta-análisis que incluía 15 estudios y llegaron a las siguientes conclusiones:

- se debía realizar biopsia hepática a todos los pacientes cuando la dosis acumulada era de 4 gr de metotrexate.

- si los valores de las enzimas hepáticas estaban persistentemente elevados, los intervalos de realización de la biopsia debían acortarse.

- los consumidores excesivos de alcohol no deberían recibir tratamiento con metotrexate.

Sin embargo, el principal problema de este meta-análisis es la heterogeneidad de su muestra pues incluye estudios realizados con pacientes afectos de artritis reumatoide, artropatía psoriásica y artritis crónica juvenil. Con posterioridad se ha

objetivado que los pacientes afectados de artropatía psoriásica, artritis crónica juvenil y lupus eritematoso sistémico se caracterizan por presentar una mayor labilidad hepática que los afectados de artritis reumatoide.

En 1992, Phillips y colaboradores (20) realizaron un estudio retrospectivo de 134 pacientes afectados de artritis reumatoide que seguían tratamiento con metotrexate. De ellos, 3 pacientes presentaron alteraciones analíticas de su función hepática y datos histológicos de enfermedad hepática severa (fibrosis hepática y cirrosis hepática). Concluyeron que:

-la diabetes mellitus, la insuficiencia cardiaca congestiva y el síndrome de Felty habían sido los factores de riesgo de toxicidad hepática por metotrexate en sus pacientes.

-el corto período de tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento con metotrexate en sus tres pacientes sugería que la dosis acumulada de metotrexate (inferior a 1400 mg) no constituía un factor de riesgo de toxicidad.

-el tiempo de evolución de la enfermedad tampoco era un factor de riesgo de toxicidad.

-los tres pacientes tomaban el metotrexate dividido en tres dosis semanales. De acuerdo con otros autores (37) consideraron que al igual que ocurría en la artritis psoriásica, la división de la dosis durante la semana aumentaba el riesgo de toxicidad.

-en el grupo de pacientes rebiopsiados durante la realización del estudio objetivaron que la fibrosis pulmonar y la obesidad (22) también eran factores de riesgo de fibrosis hepática e indicadores de realización de biopsia.

También en 1992, Kremer destacó la disparidad de criterios existente a la hora de indicar la realización de una biopsia hepática en los pacientes afectos de artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate (25). Dos años después y como se ha señalado anteriormente se reunió un subcomité de la ACR encabezado por Kremer que después de llevar a cabo una revisión exhaustiva de la bibliografía existente hasta el momento y de sus series de pacientes establecieron otras recomendaciones con relación a la necesidad de la biopsia hepática en los pacientes afectos de artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate (26). Estas recomendaciones fueron las siguientes:

1.Determinaciones basales:

-enzimas hepáticas (AST,ALT y FFAA), albúmina, bilirrubina y serologías de virus B y C.

-otras determinaciones, incluyendo hemograma completo y creatinina sérica.

-biopsia hepática previa al tratamiento si: alcoholismo previo, infección crónica por virus B o C, o valores de AST basales

persistentemente elevados.

2. Determinar AST, ALT y albúmina cada 4-8 semanas.

3. Realizar biopsia hepática si:

-5 de 9 determinaciones de AST en un período de 12 meses (6 de 12 si las determinaciones son mensuales) son anormales.

-hay un descenso de albúmina sérica por debajo de lo normal (en el contexto de una artritis reumatoide bien controlada).

4. Si los resultados de la biopsia hepática son:

-Grados I, II o IIIA de Roenigk, reintroducir metotrexate siguiendo los puntos 2. y 3.

-Grados IIIB o IV de Roenigk, suspender metotrexate.

5. Suspender metotrexate en aquellos pacientes con anomalías en los test de función hepática (como en 3.) que rechacen la biopsia hepática.

Para estos autores, además de los datos analíticos, los únicos factores de riesgo a tener en cuenta son el consumo excesivo de alcohol y la coexistencia de una hepatitis crónica (26,28). No obstante, los mismos autores coinciden en el hecho de que no hay una correlación directa entre los datos bioquímicos y los hallazgos histológicos por lo que son necesarios nuevos estudios para detectar otros indicadores de biopsia hepática.

En 1995, Erickson y colaboradores (38) en un estudio que incluía 112 pacientes afectados de artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate aplicó las recomendaciones de la ACR para la realización de biopsia hepática. Observó que cuatro de los cinco pacientes con afección hepática severa en la biopsia hepática habrían sido detectados mediante las recomendaciones de la ACR pero un paciente afecto de diabetes mellitus insulino dependiente y en el que se objetivó la existencia de cirrosis hepática en su biopsia, no se habría detectado. Por este motivo, recomienda incluir la diabetes mellitus insulino dependiente entre los factores de riesgo de toxicidad hepática por metotrexate en los pacientes afectados de artritis reumatoide.

También existen estudios de coste-efectividad como el publicado por Bergquist y colaboradores (39) que han apoyado la necesidad de encontrar marcadores de realización de biopsia hepática.

Estos autores concluyen que la realización de biopsias hepáticas como monitorización de la toxicidad hepática del metotrexate en los pacientes con artritis reumatoide ofrece una mala relación coste-efectividad tanto a los cinco como a los diez años de tratamiento.

VII. HIPOTESIS DE TRABAJO

Se ha diseñado este protocolo de investigación con el fin de poner a prueba las siguientes hipótesis de trabajo derivadas de la experiencia clínica diaria en el tratamiento de los pacientes afectados de artritis reumatoide. Dichas hipótesis de trabajo son:

1. Los pacientes afectados de artritis reumatoide padecen una afección hepática propia de la enfermedad.
2. Aunque la toxicidad hepática del metotrexate está demostrada, a las dosis habitualmente utilizadas en la artritis reumatoide, se muestra como un tratamiento efectivo y seguro. La causa de la hepatopatía severa presentada por algunos pacientes habría que buscarla en la idiosincrasia de los mismos, de forma similar a como ocurre con la afección pulmonar.
3. Además de los datos bioquímicos, existen otros indicadores de biopsia hepática en los pacientes afectados de artritis reumatoide que siguen tratamiento con metotrexate.
4. La microscopia electrónica ofrece ventajas sobre la microscopia óptica en el estudio histológico de las biopsias hepáticas de los pacientes afectados de artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate.

VIII. DEFINICION DE OBJETIVOS

VIII.1. OBJETIVOS PRINCIPALES

1/.observar mediante microscopia óptica y electrónica la existencia de hallazgos histológicos propios de la artritis reumatoide.

2/.determinar si las anomalías histológicas atribuidas a la toxicidad hepática del metotrexate son específicas o se corresponden con las existentes en el tejido hepático de pacientes afectos de artritis reumatoide que no siguen este tratamiento.

3/.valorar si el tiempo de evolución de la artritis reumatoide y la dosis acumulada de metotrexate son, junto con las anomalías bioquímicas, marcadores de riesgo de toxicidad hepática por el fármaco y por tanto indicadores de realización de biopsia hepática. Valorar la utilidad de la determinación de los niveles séricos de P-III-P como indicador de la necesidad de realización de biopsia hepática.

4/.observar si la microscopia electrónica se muestra como una técnica más sensible que la microscopia óptica en el estudio histológico de las biopsias hepáticas de estos pacientes.

VIII.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1/.determinar si los datos analíticos se correlacionan con los resultados anatomopatológicos.

2/.encontrar las características demográficas, epidemiológicas o datos analíticos marcadores de riesgo de toxicidad hepática por metotrexate.

3/.valorar si la microscopia electrónica permite cuantificar el grado de afección hepática.

IX. MATERIAL Y METODOS

En el año 1993 se inició en el servicio de reumatología de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge un protocolo que incluyó 42 pacientes que cumplían los siguientes criterios:

- estaban diagnosticados de artritis reumatoide según los criterios revisados de la ACR (3);
- eran tributarios de seguir tratamiento con metotrexate como fármaco de segunda línea y;
- habían dado su consentimiento por escrito a la práctica de una biopsia hepática.

A este grupo de pacientes se les realizaron las siguientes exploraciones complementarias:

- una bioquímica general con función hepática y determinación de las concentraciones plasmáticas de P-III-P,
- una serología a virus de la hepatitis B y C con el objetivo de detectar aquellos pacientes afectos de hepatitis víricas silentes (sin alteraciones analíticas de la función hepática), ya que la administración de metotrexate a estos pacientes podría reactivar la replicación del virus,
- un estudio inmunológico que incluyó la determinación de anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos antimitocondriales,

anticuerpos antimúsculo liso y anticuerpos anti-LKM (liver kidney mouse). Con este estudio se detectaban aquellos pacientes afectados de una cirrosis biliar primaria o una hepatitis crónica autoinmune igualmente silentes que podrían manifestarse con la administración de metotrexate,

-una radiografía de tórax,

-una ecografía abdominal,

-una gammagrafía hepatoesplénica y,

-en colaboración con los servicios de gastroenterología y de radiodiagnóstico de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge, una biopsia hepática mediante punción percutánea bajo control ecográfico a los pacientes que no presentaban alteraciones en las pruebas de coagulación ni en las pruebas de imagen y habían dado su consentimiento por escrito.

Las muestras obtenidas se dividían en dos partes. Una de ellas se incluía en formol para el estudio mediante microscopia óptica y la otra en glutaraldehído al 2% para el estudio mediante microscopia electrónica. Posteriormente y conjuntamente con el servicio de anatomía patológica de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge se llevó a cabo el estudio histológico de dichas muestras mediante microscopia óptica y más tarde mediante microscopia electrónica.

Las muestras destinadas al estudio mediante microscopia óptica fueron teñidas con hematoxilina-eosina y con la tinción tricromo de Masson específica de las fibras de reticulina. Cada muestra fue clasificada según los estadios de Roenigk (5).

Las muestras destinadas al estudio mediante microscopia electrónica fueron fijadas en glutaraldehído al 2% durante un mínimo de 2 días, posteriormente lavadas con el buffer fosfato de Sorensen y finalmente fijadas en tetroxido de osmio al 1%. Las fijaciones fueron deshidratadas progresivamente, lavadas con óxido de propileno e incluidas en Epon 812.

En cada muestra se valoraron en una escala de 0-4 el incremento del retículo endoplasmático liso, la presencia o incremento de vacuolas de lípidos y el incremento de lisosomas en los hepatocitos así como la presencia o incremento de fibras de colágeno en el espacio Disse (26).

Los criterios de exclusión fueron:

- existencia de hepatopatía previa y/o alteraciones analíticas de la función hepática,
- serologías positivas a virus de la hepatitis B ó C,
- existencia de un estudio inmunológico que hiciera sospechar la presencia de una cirrosis biliar primaria o de una hepatitis crónica autoinmune silentes,

- alteraciones de la anatomía hepática detectadas por ecografía que implicasen un aumento del riesgo en la punción hepática,
- anomalías del funcionalismo hepático observadas en la gammagrafía hepatoesplénica,
- alteraciones en las pruebas de coagulación y,
- existencia de un estadio de Roenigk IIIB ó IV en el estudio histológico de la biopsia hepática.

Los 42 pacientes incluidos siguieron tratamiento con dosis entre 7,5-15 mg/sem de metotrexate por vía oral, intramuscular o subcutánea durante un período de tiempo medio de 4 años.

Durante este tiempo los pacientes siguieron un control clínico y analítico con una periodicidad bimensual en las consultas externas del servicio de reumatología de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge.

El criterio de retirada del metotrexate fue la aparición de alteraciones analíticas en la función hepática de forma persistente.

Pasado este período medio de 4 años de tratamiento se realizó una segunda biopsia hepática a los pacientes que habían dado su consentimiento por escrito. Posteriormente se llevó a cabo el estudio histológico mediante microscopía óptica y electrónica de estas nuevas muestras.

Estudio estadístico:

Para realizar el estudio descriptivo se han utilizado las pruebas estadísticas habituales para variables continuas y discontinuas (medias, proporciones e intervalos de confianza del 95% en todos los casos). Para comparar medias de variables continuas se ha utilizado la prueba estadística T-Student para grupos independientes. Si no se cumplían las condiciones de aplicación de la T-Student, se utilizó el test estadístico de Wilcoxon. Para llevar a cabo correlaciones entre diferentes variables se han utilizado el test de Pearson para variables continuas y el test de Spearman para las variables discontinuas. Para buscar factores predictivos de fibrosis hepática se han llevado a cabo una regresión simple para variables continuas y una regresión logística múltiple en la que se han incluido variables continuas y discontinuas. Todo ello, se ha realizado utilizando el programa estadístico SPSS win v. 7.5.1.

X. RESULTADOS

El análisis de los resultados se divide en seis apartados:

1°. Estudio descriptivo de las variables analizadas en todos los pacientes incluidos.

2°. Estudio descriptivo de los hallazgos histológicos observados en las primeras biopsias hepáticas realizadas a los pacientes antes de iniciar el tratamiento con metotrexate.

3°. Estudio descriptivo de los hallazgos histológicos observados en las segundas biopsias hepáticas realizadas a los pacientes después de seguir tratamiento con metotrexate durante una media de 4 años.

4°. Comparación de los datos clínicos, analíticos e histológicos obtenidos en el momento de la realización de la primera biopsia hepática con los obtenidos en el momento de la segunda biopsia hepática.

5°. Correlación entre los resultados observados mediante microscopia óptica y electrónica.

6°. Estudio de los factores de riesgo de toxicidad hepática por metotrexate.

X.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS PACIENTES

En las siguientes tablas se exponen los valores obtenidos de las variables estudiadas en los 42 pacientes afectados de artritis reumatoide incluidos en este estudio.

TABLA 1. Características de los 42 pacientes afectados de artritis reumatoide en el momento de la 1ª biopsia hepática (I)

Nº mujeres/nº hombres	31/11
Edad media (interv.)	58 (28-76)
Tiempo de evolución media de la AR, años (interv.)	13 (4-30)
Nº artic. dolorosas, media+DS	16 + 6
Nº artic. tumefactas, media+DS	8 + 4
Factor reumatoide positivo, nº (%)	34 (81)
Consumidores de alcohol previos, nº (%)	3 (7)
Fumadores previos, nº (%)	5 (12)
Presencia de erosiones en la Rx simple, nº (%)	31 (74)
Presencia de nódulos reumatoides, nº (%)	9 (21)
Grado funcional (Steinbroker), nº (%):	
I	3 (7)
II	23 (55)
III	13 (31)
IV	3 (7)

TABLA 2. Características de los 42 pacientes afectos de artritis reumatoide en el momento de la 1ª biopsia hepática (II)

Tratamiento con AINE, n° (%)	40 (95)
Tratamiento con metilprednisolona, n° (%)	41 (98)
Dosis diaria media de metilprednisolona, mg (interv.)	4 (2-6)
Tratamiento con ARAL previos, n° (%):	
Sales de oro	34 (81)
Cloroquina	14 (33)
D-Penicilamina	14 (33)
Azatioprina	3 (7)
Ciclofosfamida	1 (2)
Ciclosporina	2 (5)
Salazopirina	9 (21)
Levamisol	1 (2)
Sin ARAL previos	6 (14)

TABLA 3. Características de los 42 pacientes afectos de artritis reumatoide en el momento de la 1ª biopsia hepática (III)

Rx tórax:		
Normal, n° (%)		34 (81)
"Patológica", n° (%)		8 (19)
Ecografía abdominal:		
Normal, n° (%)		40 (95)
"Patológica", n° (%)		2 (5)
Gammagrafía hepática (n=39):		
Normal, n° (%)		25 (64)
Hepatomegalia, n° (%)		14 (36)
P-III-P (n=20):		
Media (interv.)		0,530 (0,30-1,1)
Patológico (>0,8 U/ml) n° (%)		0 (0)
Inmunología:		
HBsAg +	(n=35) n° (%)	0 (0)
HBcAC +	(n=34) n° (%)	4 (12)
HCV +	(n=30) n° (%)	0 (0)
ANA +	(n=37) n° (%)	13 (35)
AC antimitoc. +	(n=23) n° (%)	0 (0)
AC antimusc. liso +	(n=23) n° (%)	10 (43)
AC LKM +	(n=23) n° (%)	0 (0)

Los 8 pacientes con radiografía de tórax "patológica" presentaban un discreto patrón intersticial bilateral que no se consideró motivo de exclusión del estudio.

Los 2 pacientes con ecografía abdominal "patológica" presentaban una leve esteatosis que tampoco motivó su exclusión del estudio.

La gammagrafía hepática de estos pacientes resultó normal.

Sin embargo, en varios pacientes cuyas ecografías abdominales habían resultado normales, la gammagrafía hepática demostró la existencia de pequeñas imágenes quísticas o calcificaciones así como discretas hepatomegalias que tampoco se consideraron motivo de exclusión.

Alrededor del 40% de los pacientes presentaron AC antinucleares positivos y AC antimúsculo liso positivos a títulos bajos por lo que tampoco se consideraron motivo de exclusión del estudio.

En la tabla 4 se detallan las características de los 24 pacientes afectados de artritis reumatoide en el momento de la segunda biopsia hepática.

TABLA 4. Características de los 24 pacientes afectados de artritis reumatoide en el momento de la 2ª biopsia hepática

Nº artic. dolorosas, media+DS	4 + 5
Nº artic. tumefactas, media+DS	2 + 3
P-III-P (n=20):	
Media (interv.)	0,210 (0,118-0,302)
Patológico (>0,8 U/ml), nº (%)	0 (0)
Tiempo medio de administración de MTX, años (interv.)	4 (2-5)
Dosis semanal media de MTX, mg (interv.)	10 (7,5-15)
Dosis media acumulada de MTX, mg (interv.)	1858 (1080-3360)

Las causas de abandono de los 18 pacientes restantes fueron:

- 7 se negaron a la realización de una segunda biopsia hepática,
- 2 abandonaron el tratamiento con metotrexate; uno por iniciativa propia y el otro por indicación médica,
- 4 presentaron una situación clínica por otros motivos que desaconsejaba la realización de la segunda biopsia hepática,
- 1 fue exitus en el transcurso del estudio y,
- 4 dejaron de acudir a los controles por cambios de residencia.

La ecografía abdominal y la gammagrafía hepática llevadas a cabo antes de la realización de la segunda biopsia hepática no mostraron variaciones significativas respecto a las iniciales.

Nueve pacientes presentaron efectos secundarios relacionados con el uso del metotrexate:

- 6 presentaron elevación de los valores plasmáticos de transaminasas (AST/ALT) que se solucionaron con la disminución de la dosis semanal de metotrexate en 5 mg durante aproximadamente un mes. Posteriormente fue posible aumentar de nuevo la dosis de forma progresiva.
- 2 presentaron herpes zoster que motivaron la retirada del metotrexate durante aproximadamente 15 días, reintroduciéndolo posteriormente sin problemas.

- 1 presentó un aumento de las fosfatasas alcalinas que motivó el abandono del tratamiento con metotrexate. Después de seis meses sin tratamiento sus valores se normalizaron.

Ningún paciente presentó complicaciones relacionadas con la realización de ambas biopsias hepáticas.

X.2. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS HALLAZGOS HISTOLOGICOS
OBSERVADOS EN LAS PRIMERAS BIOPSIAS HEPATICAS

X.2.1 Estudio descriptivo de los hallazgos histológicos
observados, mediante microscopia óptica, en las primeras
biopsias hepáticas

En el estudio histológico de las muestras mediante microscopia
óptica se consideraron las siguientes variables:

- dilatación sinusoidal
- depósitos de lipofucsina (pigmento de desgaste inespecífico)
- presencia y grado de esteatosis
- fibrosis perisinusoidal
- estadio de Roenigk

La tabla 5 refleja los resultados tras el estudio de las mismas.

TABLA 5. Características histológicas observadas mediante microscopia óptica en las 1ª biopsias hepáticas.

Dilatación sinusoidal, n° (%)	40 (95)
Depósito de lipofucsina, n° (%)	15 (36)
Grado de esteatosis, n° (%):	
Menor del 10%	25 (59)
Entre 10 y 40%	6 (14)
Mayor del 40%	1 (2)
Fibrosis perisinusoidal, n° (%)	6 (14)
Estadio de Roenigk, n° (%):	
I	17 (40)
I-II	6 (14)
II	13 (31)
IIIa	6 (14)

n° total de pacientes con 1ª biopsia hepática = 42

El 14% de los pacientes presentaba fibrosis perisinusoidal.

Como dato complementario a los reseñados en la tabla anterior, y haciendo referencia a la variable grado de esteatosis, cabe señalar que 10 pacientes (25%) no presentaron signos de esteatosis hepática en sus muestras.

X.2.2 Estudio descriptivo de los hallazgos histológicos observados, mediante microscopia electrónica, en las primeras biopsias hepáticas

En el estudio histológico de las muestras mediante microscopia electrónica se consideraron las siguientes variables:

- incremento del retículo endoplasmático liso
- aumento de depósitos lipídicos
- incremento del número de lisosomas
- aumento de los depósitos de colágeno en el espacio Disse

Las figuras 1-4 muestran las imágenes de los hallazgos histológicos observados mediante microscopia electrónica en las biopsias hepáticas de estos pacientes.

Figura 1. Vista general de un sinusoides hepático. Se observa dilatación sinusoidal, hiperplasia de las células de Kupffer, aumento del volumen del retículo endoplasmático liso, incremento de depósitos lipídicos y fibrosis incipiente.

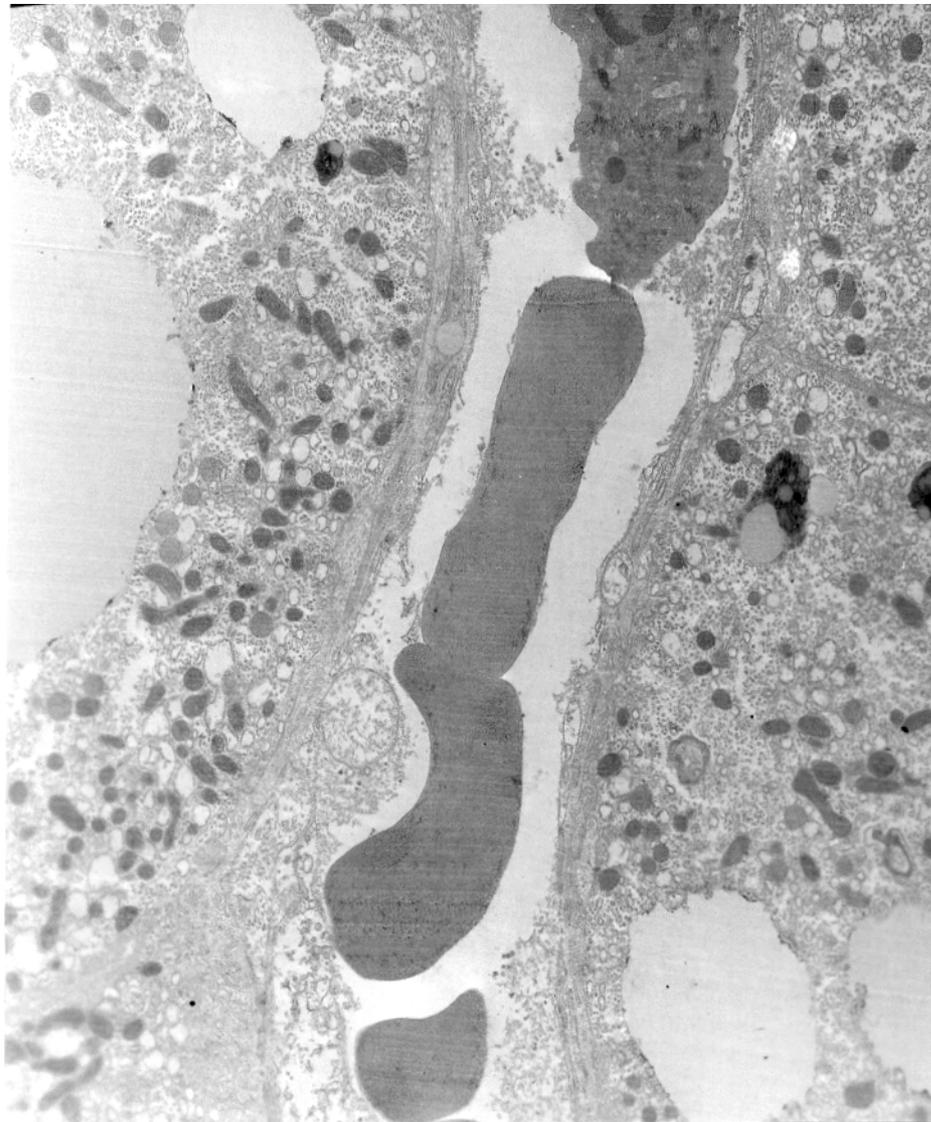


Figura 2. Imagen general del aumento del volumen del retículo endoplasmático liso.

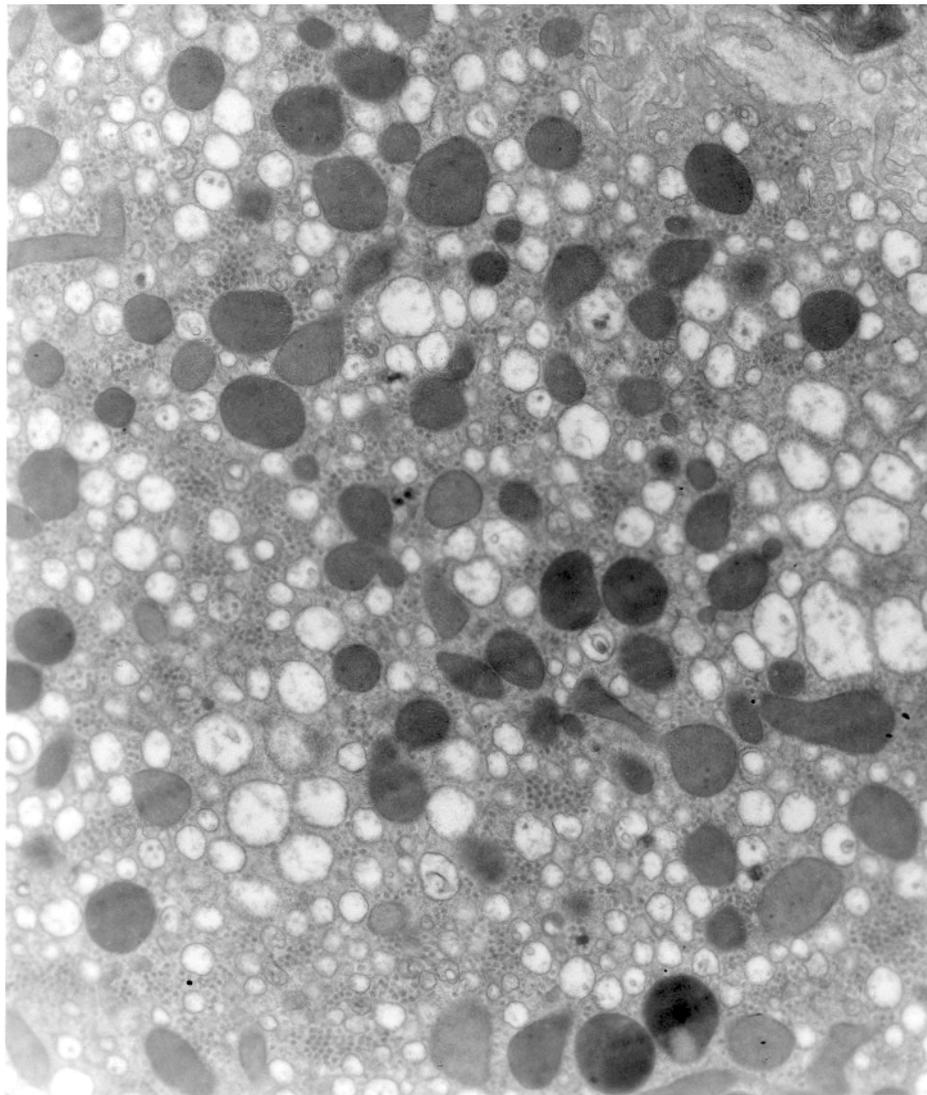


Figura 3. Imagen más detallada del aumento del retículo endoplasmático liso observado en las biopsias hepáticas de los pacientes afectados de artritis reumatoide.

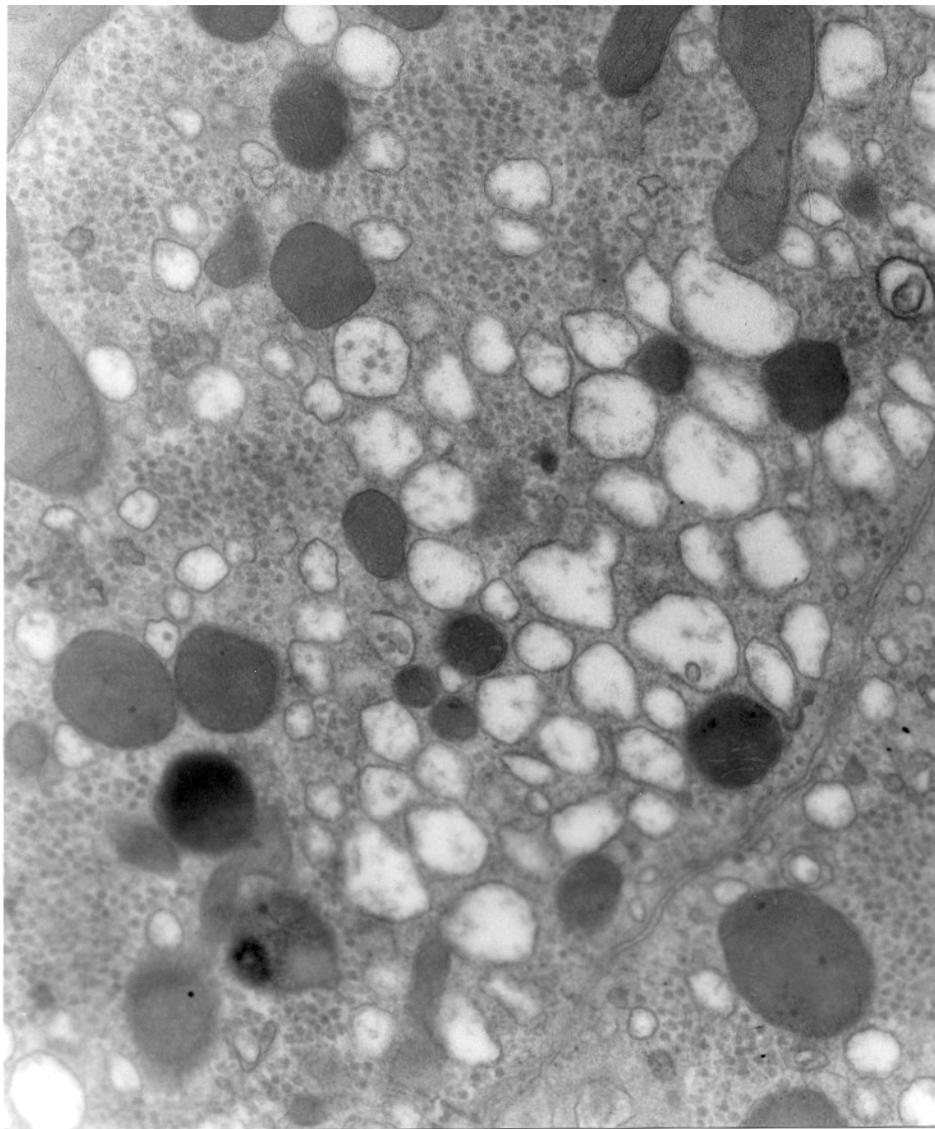
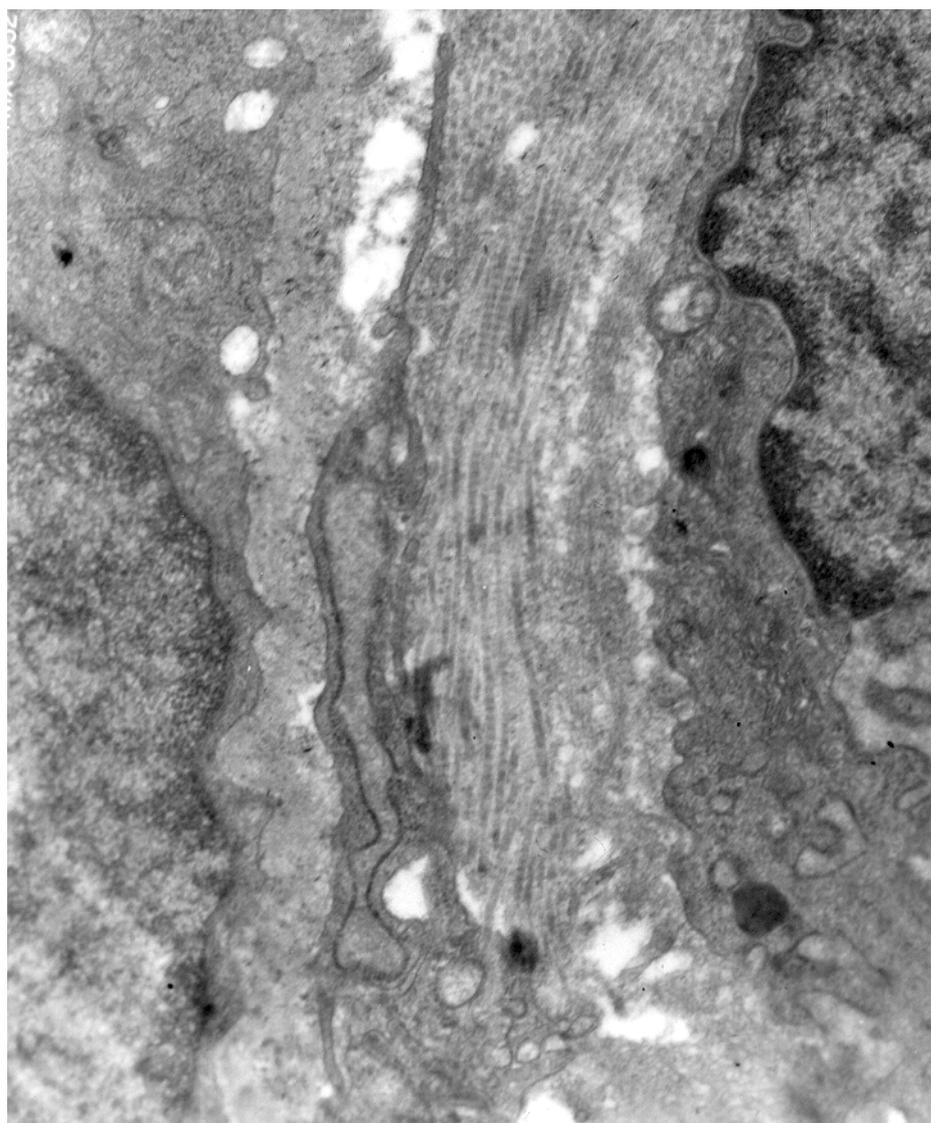


Figura 4. Imagen de los depósitos de fibras de colágeno en los espacios disse.



La tabla 6 detalla los valores obtenidos en el estudio de dichas variables.

TABLA 6. Características histológicas observadas mediante microscopia electrónica en las 1ª biopsias hepáticas.

Aumento del REL, nº (%):	
Ausencia	18 (43)
Leve	15 (36)
Moderado	8 (19)
Importante	1 (2)
Aumento de lípidos, nº (%):	
Ausencia	2 (5)
Leve	30 (72)
Moderado	9 (21)
Importante	1 (2)
Aumento del nº de lisosomas, nº (%):	
Ausencia	2 (5)
Leve	23 (55)
Moderado	15 (36)
Importante	2 (4)
Aumento de colágeno en Disse, nº (%):	
Ausencia	21 (50)
Leve	18 (43)
Moderado	3 (7)

nº total de pacientes con 1ª biopsia hepática = 42

Como datos importantes a reseñar caben destacar los siguientes:

- sólo el 5% de los pacientes no presentaban ningún grado de depósito lipídico ni de incremento del número de lisosomas.
- En más del 50% de los pacientes se objetivó un incremento del retículo endoplasmático liso.
- El 50% de los pacientes presentaban algún grado de aumento del colágeno en los espacios Disse.

X.3. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS HALLAZGOS HISTOLOGICOS
OBSERVADOS EN LAS SEGUNDAS BIOPSIAS HEPATICAS

X.3.1 Estudio descriptivo de los hallazgos histológicos
observados, mediante microscopia óptica, en las segundas
biopsias hepáticas

En la siguiente tabla se detallan los valores obtenidos tras el
estudio de las distintas variables.

**TABLA 7. Características histológicas observadas mediante
microscopia óptica en las 2ª biopsias hepáticas**

Dilatación sinusoidal, nº (%)	24 (100)
Depósito de lipofucsina, nº (%)	10 (42)
Grado de esteatosis, nº (%):	
Menor del 10%	10 (42)
Entre 10 y 40%	4 (17)
Mayor del 40%	2 (8)
Fibrosis perisinusoidal, nº (%)	3 (12)
Estadio de Roenigk, nº (%):	
I	10 (42)
I-II	3 (12)
II	8 (33)
IIIa	3 (12)

nº total de pacientes con 2ª biopsia hepática = 24

Destaca el hecho que el tanto por ciento de pacientes con fibrosis perisinusoidal se mantuvo alrededor del 12%.

Como dato complementario a los reseñados en dicha tabla, y haciendo referencia a la variable grado de esteatosis, cabe señalar que 8 pacientes (33%) no presentaron signos de esteatosis hepática en sus muestras.

X.3.2 Estudio descriptivo de los hallazgos histológicos observados, mediante microscopia electrónica, en las segundas biopsias hepáticas

En la tabla 8 se detallan los valores obtenidos en el estudio de las distintas variables.

TABLA 8. Características histológicas observadas mediante microscopia electrónica en las 2ª biopsias hepáticas

Aumento del REL, nº (%):	
Ausencia	2 (8)
Leve	14 (58)
Moderado	6 (26)
Importante	2 (8)
Aumento de lípidos, nº (%):	
Ausencia	0 (0)
Leve	10 (42)
Moderado	11 (46)
Importante	3 (12)
Aumento del nº de lisosomas, nº (%):	
Ausencia	0 (0)
Leve	8 (33)
Moderado	12 (50)
Importante	4 (17)
Aumento de colágeno en Disse, nº (%):	
Ausencia	8 (34)
Leve	14 (58)
Moderado	2 (8)

nº total de pacientes con 2ª biopsia hepática = 24

Como datos a destacar caben señalar los siguientes:

- sólo 2 pacientes (8%) no presentaban un aumento del retículo endoplasmático liso en sus biopsias hepáticas.
- todos los pacientes presentaban un aumento de depósitos lipídicos en sus biopsias hepáticas.
- todos los pacientes presentaban un incremento en el número de lisosomas en sus biopsias hepáticas.

X.4. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS DATOS CLINICOS, ANALITICOS
E HISTOLOGICOS OBTENIDOS EN EL MOMENTO DE LA PRIMERA Y LA
SEGUNDA BIOPSIAS HEPATICAS

El estudio de comparación entre las variables clínicas número de articulaciones dolorosas y número de articulaciones tumefactas en el momento de la realización de ambas biopsias hepáticas mostró diferencias significativas como puede observarse en la siguiente tabla.

TABLA 9. Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig.(2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
NAD1-NADF	11.45	7.03	1.08	9.26	13.64	10.557	41	0.000
NAT1-NATF	5.64	5.16	0.80	4.03	7.25	7.081	41	0.000

NAD1: nº articulaciones dolorosas iniciales. NADF: nº articulaciones dolorosas finales.
NAT1: nº articulaciones tumefactas iniciales. NATF: nº articulaciones tumefactas finales.

En cuanto a las variables analíticas, mientras la VSG y la PCR mostraron diferencias significativas, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los marcadores de afección hepática (AST, ALT, GGT, FFAA, bilirrubina, albúmina, P-III-P) determinados en el momento de la realización de ambas biopsias hepáticas.

TABLA 10. Wilcoxon Signed Ranks Test

	VSGF-VSG1	PCRF-PCR1	AlbF-Alb1	PIIIPF-PIIIP1
Z	-2.758	-2.155	-0.749	-0.680
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.006	0.031	0.454	0.496

	BiIF-Bil1	GOTF-GOT1	GPTF-GPT1	GGTF-GGT1	FFAAF-FFAA1
Z	-0.782	-0.284	-0.019	-0.243	-1.271
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.434	0.776	0.985	0.808	0.204

Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas de imagen (ecografía y gammagrafía hepática) llevadas a cabo en el momento de la realización de ambas biopsias hepáticas.

No observamos diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las variables (dilatación sinusoidal, depósitos de lipofucsina, grado de esteatosis, fibrosis perisinusoidal y estadio de Roenigk) analizadas tras el estudio histológico de ambas biopsias hepáticas mediante microscopia óptica.

TABLA 11. Wilcoxon Signed Ranks Test

	DSf-DSi	DLf-DLi	ESTf-ESTi	FIBf-FIBi	ERf-ERi
Z	0.000	0.000	-1.890	-1.000	0.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	1.000	0.059	0.317	1.000

DS: dilatación sinusoidal, DF: depósitos de lipofucsina, EST: esteatosis, FIB: fibrosis perisinusoidal, ER: estadio de Roenigk

Sin embargo, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas en el estudio comparativo de algunas de las variables analizadas tras el estudio histológico de ambas biopsias hepáticas mediante microscopía electrónica.

Así, observamos un incremento del retículo endoplasmático liso, un aumento de depósitos lipídicos y un incremento del número de lisosomas en las segundas biopsias hepáticas respecto a las primeras. El aumento de los depósitos de colágeno en el espacio Disse no fue estadísticamente significativo ($p=0.059$).

TABLA 12. Wilcoxon Signed Ranks Test

	RELf-RELi	LIPf-LIPi	LISf-LISi	COLf-COLi
Z	-3.153	-3.441	-3.000	-1.890
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.002	0.001	0.003	0.059

REL: retículo endoplasmático liso, LIP: lípidos, LIS: lisosomas, COL: depósitos de fibras de colágeno en espacios Disse

X.5. ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBSERVADOS
 MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las dos tablas siguientes demuestran la correlación existente entre ambas técnicas de microscopía.

TABLA 13. Correlaciones.

			Esteatosis inicial	Aumento lípidos inicial
Spearman's rho	Correlation Coefficient	Esteatosis inicial	1.000	0.716*
		Aumento lípidos inicial	0.716*	1.000
	Sig. (2-tailed)	Esteatosis inicial		0.000
		Aumento lípidos inicial	0.000	
	N	Esteatosis inicial	42	42
		Aumento lípidos inicial	42	42

(*). Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

TABLA 14. Correlaciones.

			Fibrosis perisinusoidal inicial	Aumento colágeno en Disse inicial
Spearman's rho	Correlation Coefficient	Fibrosis perisinusoidal inicial	1.000	0.377*
		Aumento colágeno en Disse inicial	0.377*	1.000
	Sig. (2-tailed)	Fibrosis perisinusoidal inicial		0.014
		Aumento colágeno en Disse inicial	0.014	
	N	Fibrosis perisinusoidal inicial	42	42
		Aumento colágeno en Disse inicial	42	42

(*). Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Como puede observarse en las tablas anteriores, las variables estudiadas por ambas técnicas de microscopia presentan una correlación estadísticamente significativa.

X.6. ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO DE TOXICIDAD HEPATICA POR METOTREXATE

Se ha realizado un estudio de regresión múltiple con el método de exclusión secuencial para variables dependientes continuas y un estudio de regresión logística para variables dependientes dicotómicas.

X.6.1 Estudio de regresión múltiple

Cuando utilizamos como variable dependiente continua el estadio de Roenigk en el momento de la realización de la segunda biopsia hepática el estudio incluyó las variables edad, alcohol, tiempo de evolución de la artritis reumatoide y las variables analíticas GGT y albúmina en el momento de la realización de la segunda biopsia hepática.

TABLA 15. Método de regresión. Variables incluidas .

Modelo		Coeficientes No estandarizados		Coeficientes Estandarizados
		B	Error Std.	Beta
1.000	(Constante)	-2.406	0.000	
	Edad	0.034	0.000	0.278
	Alcohol	0.303	0.000	0.070
	Tiempo de evolución de la AR	-0.015	0.000	-0.083
	GGTf	1.460	0.000	0.270
	Albf	0.017	0.000	0.065

Variable dependiente : Estadio de Roenigk final

De esta forma, obtendríamos la siguiente recta:

$$ERf = -2.406 + 0.034 \text{ edad} + 0.303 \text{ alcohol} - 0.015 \text{ t}^\circ\text{evolución} + 1.460 \text{ GGTf} + 0.017 \text{ ALBf}$$

El resto de las variables fueron excluidas por el estudio, entre ellas cabe destacar la variable dosis acumulada de metotrexate.

TABLA 16. Método de regresión. Variables excluidas.

Modelo		Beta In	Correlación Parcial	Linearidad Estadística
				Tolerancia
1	Tabaco	-0.604	-0.607	0.696
	Grado funcional	0.054	0.058	0.783
	Erosiones	-0.003	-0.003	0.737
	Factor reumatoide	-0.297	-0.317	0.780
	Gammagrafia hepática	0.230	0.254	0.841
	Dosis acumulada MTX	0.442	0.443	0.690
	GOTf / GPTf	0.107/0.144	0.102/0.142	0.632/0.669
	FFAAf	0.118	0.127	0.796
	P-III-P	-0.836	-0.535	0.282

Variable dependiente: Estadio de Roenigk final

X.6.2 Estudio de regresión logística

Posteriormente dicotomizamos la variable estadio de Roenigk en el momento de la realización de la segunda biopsia hepática (ERf) y realizamos el mismo procedimiento estadístico con todas las variables examinadas en el estudio mediante microscopia electrónica de las segundas biopsias hepáticas (RELf, LIPf, LISf y COLf). Las incluimos por separado como variables dependientes

dicotómicas en el estudio de regresión logística para variables dependientes dicotómicas. Únicamente al utilizar como variable dependiente el aumento de retículo endoplasmático liso en el momento de la realización de la segunda biopsia hepática (RELf) el estudio incluyó la variable alcohol con una constante = - 0.9555 y una b = 9.1580.

TABLA 17. Regresion logística.

Variables en la ecuación para el RELf

Variable	Constant	B	Significance of log LR
ALCOHOL	-0.9555	9.1580	0.0237

RELf: aumento del retículo endoplasmático liso final (en la segunda biopsia hepática)

Cuando utilizamos cualquier otra variable como variable dependiente, entre ellas el estadio de Roenigk en el momento de la realización de la segunda biopsia hepática (ERf), el estudio de regresión no aceptó la inclusión de ninguna variable.

XI. DISCUSION

Al igual que con los resultados se realizará la discusión dividida en apartados, con unas consideraciones finales sintetizadas en las conclusiones.

Las características descriptivas de la serie son las habituales en series hospitalarias de artritis reumatoide : predominio del sexo femenino con una edad media de 58 años y un tiempo de evolución media de la artritis reumatoide de 13 años. El factor reumatoide fue positivo en el 80% de los pacientes, el 55% de los pacientes se encontraban en un estadio funcional grado II de Steinbroker, el 95% seguían tratamiento concomitante con antiinflamatorios no esteroideos y el 98% estaban en tratamiento con una dosis media diaria de 4 mg de metilprednisolona o equivalentes.

Cuando analizamos los resultados del estudio histológico mediante microscopia óptica de las biopsias hepáticas realizadas antes de iniciar el tratamiento con metotrexate observamos, al igual que Laffon y colaboradores (9), que el hallazgo histológico más frecuente es la dilatación sinusoidal. El 95% de los pacientes de nuestra serie presentaban dilatación

sinusoidal. El grado de esteatosis fue inferior al 10% en el 59% de las primeras biopsias. El 14% de los pacientes presentaban fibrosis perisinusoidal en las biopsias hepáticas previas al tratamiento con metotrexate. Ningún paciente de la serie presentó fibrosis severa (Roeningk IIIb). Estos datos son similares a los de otras series de pacientes afectados de artritis reumatoide pero que seguían tratamiento con metotrexate (20,21,26). En este estudio, después de una media de 4 años de tratamiento con metotrexate, ningún paciente empeoró su estadio de Roeningk, el grado de esteatosis fue inferior al 10% en el 42% de las segundas biopsias y el tanto por ciento de pacientes con fibrosis perisinusoidal se mantuvo alrededor del 12%.

Respecto al análisis de los resultados tras el estudio histológico mediante microscopia electrónica observamos, al igual que Mills (11), un aumento del volumen del retículo endoplasmático liso en mayor o menor grado en el 57% de las biopsias previas al tratamiento con metotrexate. En biopsias efectuadas durante el tratamiento, Kremer (27) observó una disminución del volumen del retículo endoplasmático liso en sus pacientes afectados de artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate. En nuestra serie en cambio objetivamos un incremento de dicho volumen en el 92% de las segundas biopsias. También objetivamos un aumento del depósito de fibras de

colágeno en los espacios Disse así como un aumento del número de lisosomas tras el estudio mediante microscopia electrónica de ambas biopsias hepáticas. Bjorkmann (31) observó resultados similares en las biopsias de sus pacientes tratados con metotrexate. El 95% de los pacientes presentaban algún grado de aumento del depósito de lípidos hepáticos antes de iniciar el tratamiento con metotrexate. Este porcentaje era del 100% en las segundas biopsias.

La discrepancia entre los resultados de Kremer y los de nuestra serie respecto al volumen del retículo endoplasmático liso podrían ser explicados por la duración del estudio.

Cuando realizamos el análisis comparativo de datos clínicos, como el número de articulaciones dolorosas y el número de articulaciones tumefactas, así como de datos analíticos como la VSG y la proteína C reactiva antes y después de seguir tratamiento con metotrexate comprobamos la ya demostrada efectividad del metotrexate en el tratamiento de la artritis reumatoide (40). En cuanto a los parámetros analíticos de función hepática, no hemos encontrado diferencias significativas entre sus valores antes y después del tratamiento con metotrexate. Sin embargo, este hecho no es valorable en nuestra serie pues durante el seguimiento de los pacientes se han

utilizado las recomendaciones de la ACR (26).

No se han objetivado diferencias estadísticamente significativas entre los datos histológicos observados mediante microscopia óptica en ambas biopsias hepáticas. Sin embargo, sí se han objetivado diferencias significativas entre los hallazgos histológicos observados mediante microscopia electrónica. Así, existen diferencias significativas en el volumen del retículo endoplasmático liso ($p=0.002$), en el depósito de lípidos ($p=0.001$), en el aumento del número de lisosomas ($p=0.003$) pero no en el depósito de fibras de colágena en los espacios Disse ($p=0.059$).

En este estudio, la microscopia electrónica ha demostrado tener una mayor sensibilidad que la microscopia óptica al detectar fibrosis perisinusoidal en biopsias que la microscopia óptica consideraba normales. No obstante, la buena correlación entre ambas técnicas de microscopia, la ausencia de diferencias significativas entre el depósito de fibras de colágeno en el espacio disse entre ambas biopsias, la falta de implicación del metotrexate en las diferencias significativas encontradas en otras variables estudiadas en ambas biopsias junto con la relación coste-beneficio no indicarían la realización del estudio mediante microscopia electrónica de las biopsias

hepáticas en estos pacientes.

Con el objetivo de detectar aquellos datos clínicos, analíticos o epidemiológicos que indicaran un mayor riesgo de toxicidad hepática en los pacientes afectados de artritis reumatoide en tratamiento con metotrexate realizamos un estudio de regresión múltiple. Las únicas variables que implicarían la existencia de un peor estadio de Roenigk son la edad del paciente, la ingesta de alcohol, el tiempo de evolución de la artritis reumatoide, los niveles plasmáticos de gammaglutamiltransferasa (GGT) y los niveles plasmáticos de albúmina. Algunos autores han observado una buena correlación entre los niveles plasmáticos de AST y los hallazgos histológicos. En nuestra serie no podemos valorar estos resultados pues hemos seguido las recomendaciones de la ACR en el seguimiento de los pacientes, disminuyendo la dosis de metotrexate cuando detectábamos una elevación de las cifras plasmáticas de transaminasas (AST/ALT) en los controles analíticos. Sí coincidimos en la utilidad de los niveles plasmáticos de albúmina como seguimiento de la afección hepática en estos pacientes (29). También coincidimos en el hecho de que los 6 pacientes que presentaron una elevación de las cifras plasmáticas de transaminasas lo hicieron durante los primeros dos años de tratamiento con metotrexate (20,29).

Sin embargo, nuestro estudio no corrobora otros parámetros inicialmente señalados como indicadores de biopsia hepática por constituir un factor de riesgo de toxicidad hepática en los pacientes en tratamiento con metotrexate, como son los niveles plasmáticos de P-III-P (33,34), la dosis acumulada de metotrexate (23,36) o la gammagrafía hepática (41).

Como resumen, y después del análisis de los datos histológicos derivados del estudio mediante ambas técnicas de microscopia, observamos la existencia de hallazgos similares en ambas biopsias; la realizada previamente al inicio del tratamiento y la realizada después de una media de 4 años de tratamiento con metotrexate. Además, entre los factores de riesgo de toxicidad hepática en los pacientes afectos de artritis reumatoide no se encuentra la dosis acumulada de metotrexate y sí variables ligadas a la propia enfermedad como es el tiempo de evolución de la misma. Estos datos sugieren que la principal causa de hepatopatía en los pacientes afectos de artritis reumatoide es la propia enfermedad. Por ello, deberemos extremar las precauciones cuando indiquemos el tratamiento con metotrexate a pacientes afectos de esta enfermedad y que tengan edad avanzada o un largo tiempo de evolución de la misma, así como otras circunstancias predisponentes.

XII. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, como conclusiones y respondiendo a las cuatro hipótesis, podemos decir que:

1. los pacientes afectos de artritis reumatoide presentan una afección hepática por la propia enfermedad.

2. el metotrexate a las dosis empleadas habitualmente en el tratamiento de la artritis reumatoide constituye un fármaco efectivo y seguro. Los casos de alteración de los parámetros analíticos de función hepática ocurrieron durante los dos primeros años del mismo y se solucionaron con la disminución de forma temporal de la dosis de metotrexate.

3. además de las recomendaciones de la ACR (26) basadas principalmente en datos bioquímicos, algunos como los niveles plasmáticos de GGT y de albúmina confirmados en nuestra serie; la edad del paciente, la ingesta de alcohol y el tiempo de evolución de la artritis reumatoide serían factores de riesgo de toxicidad hepática por metotrexate. Sin embargo, no los consideraríamos indicadores de realización de biopsia hepática porque posiblemente el resultado de la misma no implicaría un

cambio en la actitud terapéutica.

En nuestro estudio no podemos evaluar el valor de los niveles plasmáticos de AST/ALT como marcadores de afección hepática.

Otros parámetros como la dosis acumulada de metotrexate y los niveles séricos de P-III-P no son buenos marcadores de afección hepática en estos pacientes.

4. la microscopia electrónica constituye una técnica más sensible que la microscopia óptica. Permite la detección de pequeños depósitos lipídicos y acúmulos de colágeno en los espacios Disse cuando la microscopia óptica no considera la existencia de los mismos. No obstante, ambas técnicas presentan una buena correlación entre sí por lo que la relación coste-beneficio no indicaría la necesidad de analizar mediante microscopia electrónica las muestras hepáticas de estos pacientes.

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Gubner R, August S, Ginsberg V: Therapeutic suppression of tissue reactivity. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am J Med Sci* 1951; 22: 176
2. Spooner RJ, Smith DH, Bedford D, Beck PR: Serum gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase in rheumatoid arthritis. *J Clin Pathol* 1982; 35: 638-641
3. Arnett FC et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315
4. Weiss L, Greep RO. *Histología*. 4ª edición. 1982. Ediciones El Ateneo SA. En *Hígado y vesícula biliar* de Albert L Jones y Elinor Spring-Mills 624-664
5. Roenigk HH, Auerbach R, Maibach HI et al: Methotrexate in psoriasis: revised guidelines. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 145
6. Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB: *Textbook of Rheumatology*. 4ª edición. WB Saunders Company, 1994.

7. Mc Carty DJ, Koopman WJ: Arthritis and allied conditions. 12^a edición. Lea and Febiger. 1993
8. Martin A, Lore P, Chales G, Meadeb J, Frocrain L, Pawlotsky Y: Foie et polyarthrite rhumatoide. Rev Rhum Mal Osteoartic 1987; 54: 589-594
9. Laffon A, Moreno A, Gutierrez-Bucero A, Ossorio C, Sabando P, Moreno-Otero R: Hepatic sinusoidal dilatation in rheumatoid arthritis. J Clin Gastroenterol 1989; 11: 653-657
10. Ruderman EM, Crawford JM, Maier A, Liu JJ, Gravallesse EM, Weinblatt ME: Histologic liver abnormalities in an autopsy series of patients with rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol 1997; 36: 210-213
11. Mills PR, Mc Sween RNM, Dick WC, More IA, Watkinson G: Liver disease in rheumatoid arthritis. Scott med J 1980; 25: 18-22
12. Mc Carty DJ, Koopman WJ. Arthritis and allied conditions. Volumen 1. 12^a edición. 1993. Lea and Febiger. En Methotrexate por Rooney TW y Furst DE. 621-636

13. Ertmann R, Landbech G: Effects of oral cholestyramine on elimination of high dose methotrexate. *J Cancer Res Clin Oncol* 1985; 110: 48-50
14. Rabinovitz M, Van Thiel DH: Hepatotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1696-1704
15. Espinoza LR, Zakraoui L, Espinoza CG et al: Psoriatic arthritis: clinical response and side effects to methotrexate therapy. *J Rheumatol* 1992; 19: 872-877
16. Dahl MGC, Gregory MM, Scheuer PJ: Liver damage due to methotrexate in patients with psoriasis. *Br Med J* 1971; 1: 625-630
17. Gilbert SC, Klintamalm G, Menter A, Silverman A: Methotrexate induced cirrhosis requiring liver transplantation in three patients with psoriasis. *Arch Intern Med* 1990; 150: 889-891
18. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B: Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 832-835

19. Ahern MJ, Kevat S, Hill W, Hayball PJ, Harley H, Hall P de la M: Hepatic methotrexate content and progression of hepatic fibrosis: preliminary findings. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 477-480
20. Phillips CA, Cera PJ, Mangan TF, Newman ED: Clinical liver disease in patients with rheumatoid arthritis taking methotrexate. *J Rheumatol* 1992; 19: 229-233
21. Brick JE, Moreland LW, AL-Kawas F, Chang WW, Layne RD, Di Bartolomeo AG: Prospective analysis of liver biopsies before and after methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1989; 19: 31-44
22. Whiting-O'Keefe QE, Fye KH, Sack KD: Methotrexate and histologic hepatic abnormalities: a meta-analysis. *Am J Med* 1991; 90: 711-716
23. Kremer JM, Lee RG, Tolman KG: Liver histology in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate therapy. A prospective study with baseline and sequential biopsy samples. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 121-127

24. Willkens RF, Leonard PA, Clegg DO et al: Liver histology in patients receiving low dose pulse methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 591-593

25. Kremer JM, Koff R: A debate: should patients with rheumatoid arthritis on methotrexate undergo liver biopsies?. *Semin Arthritis Rheum* 1992; 21: 376-386

26. Kremer JM, Alarcon GS, Lightfoot RW Jr et al: Methotrexate for rheumatoid arthritis. Suggested guidelines for monitoring liver toxicity. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 316-328

27. Kremer JM, Kaye GI: Electron microscopic analysis of sequential liver biopsy samples from patients with rheumatoid arthritis. Correlation with light microscopic findings. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1202-1213

28. Kremer JM, Kaye GI, Kaye NW, Ishak KG, Axiotis CA: Light and electron microscopic analysis of sequential liver biopsy samples from rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate therapy. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1194-1203

29. Kremer JM, Furst DE, Weinblatt ME, Blotner SD: Significant changes in serum AST across hepatic histological biopsy grades: prospective analysis of 3 cohorts receiving methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23: 459-461
30. Rau R, Karger T, Herborn G, Frenzel H: Liver biopsy findings in patients with rheumatoid arthritis undergoing longterm treatment with methotrexate. *J Rheumatol* 1989; 16: 489-493
31. Bjorkmann DJ, Hammond EH, Lee RG, Clegg DO, Tolman KG: Hepatic ultrastructure after methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1465-1472
32. Bjorkman DJ, Boschert M, Tolman KG, Clegg DO, Ward JR: The effect of long-term methotrexate therapy on hepatic fibrosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1697-1701
33. Risteli J, Sogaard, Oikarinen A, Risteli L, Karvonen J, Zachariae H: Aminoterminal propeptide of type III procollagen in methotrexate-induced liver fibrosis and cirrosis. *Br J Dermatol* 1988; 119: 321-325

34. Boffa MJ, Smith A, Chalmers RJ, Mitchell DM, Rowan B, Warnes TW, Shomaf M, Haboubi NY: Serum type III procollagen aminopeptide for assessing liver damage in methotrexate-treated psoriatic patients. *Br J Dermatol* 1996; 135: 538-544
35. Bridges SL, Alarcon GS, Koopman WJ: MTX-induced liver abnormalities in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989; 16: 1180-1183
36. Furst DE, Kremer JM: Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 305-314
37. Wilke WS, Kremer JM, Mackenzie AM et al: Methotrexate and rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1989; 110: 88-89
38. Erickson AR, Reddy V, Vogelgesang SA, West SG: Usefulness of the ACR recommendations for liver biopsy in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1115-1119

39. Bergquist SR, Felson DT, Prashker MJ, Freedberg KA: The cost-effectiveness of liver biopsy in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis and Rheum* 1995; 38: 326-333

40. Weinblatt ME, Maier AL, Fraser PA, Coblyn JS: Longterm prospective study of methotrexate in rheumatoid arthritis: conclusion after 132 months of therapy. *J Rheumatol* 1998; 25: 238-242

41. van Dooren-Greebe RJ, Kuijpers AL, Buijs WC, Kniest PH, Corstens FH, Nagengast FM, de Boo T, Willems JL, Duller P, van de Kerkhof PC: The value of dynamic hepatic scintigraphy and serum aminoterminal propeptide of type III procollagen for early detection of methotrexate-induced hepatic damage in psoriasis patients. *Br J Dermatol* 1996; 134: 481-487