

# Efecto in vitro del metotrexato sobre las variables reológicas de los eritrocitos.

In vitro effect of methotrexate on erythrocytes rheological variables.

**Autores: Matias Martino<sup>1</sup>, Leda Urli<sup>1</sup>, Maria José Svetaz,<sup>3</sup>; María Edith Georgetti<sup>1</sup>; Ricardo Volpintesta<sup>2</sup>; Alejandra Luquita<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

<sup>2</sup>Cátedra de Clínica Médica, Área Reumatología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

<sup>3</sup>Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

**Autor por correspondencia:** Matias Martino — [matote81@hotmail.com](mailto:matote81@hotmail.com)

**Conflicto de intereses:** no presenta.

## Resumen

El metotrexato (MTX) es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento del cáncer y de la artritis reumatoide. Entre las reacciones adversas encontradas está la anemia, por lo que nos propusimos estudiar el efecto directo del mtx sobre la reología eritrocitaria in vitro, utilizando muestras de sangre de controles sanos que se dividieron en 5 alicuotas: una se utilizó como control y a las otras se les adicionó mtx en concentraciones crecientes (0,5; 0,75; 1 y 5  $\mu$ M mtx; n: 5, cada grupo).

La forma celular fue estimada con un microscopio óptico; el índice de rigidez (IR) por filtración; la fragilidad osmótica (medida fotométricamente a 540 nm) se determinó a través del valor  $X_{50}$  (concentración de NaCl mM con 50% de hemólisis) y el grado de homogeneidad de la población celular ( $\beta$ ). La agregación eritrocitaria fue cuantificada por densitometría óptica estimándose el tamaño promedio de los agregados eritrocitarios (T) y la velocidad inicial del proceso (V).

La presencia de mtx en el medio de incubación aumentó el IR, la fragilidad osmótica (mayor  $X_{50}$ ) y la heterogeneidad de la respuesta poblacional a la hiposmolaridad ( $\beta$ ) a las dosis mayores. Estos efectos sumados a la estomatocitosis y menor deformabilidad pueden relacionarse con la anemia encontrada en los pacientes tratados con metotrexato. En la agregación eritrocitaria, si bien el tamaño (T) y la velocidad de los agregados (V) no se incrementan en presencia del fármaco, sería esperable que la dificultad de los eritrocitos con mayor rigidez al ingresar en los capilares pueda dar tiempo a la formación de agregados que obstaculicen la circulación y favorezcan la destrucción de los glóbulos rojos. Para atenuar estos efectos secundarios al tratamiento con mtx sería recomendable el control periódico del hemograma completo, el control clínico para detectar la aparición de estas situaciones en forma temprana y principalmente hacer un tratamiento con dosis de metotrexato personalizada para cada paciente.

**Palabras clave: Metotrexato. Artritis Reumatoide. Anemia. Reología Eritrocitaria.**

## Abstract

Methotrexate is one of the drugs that is generally used in cancer and rheumatoid arthritis treatments. Anemia is one of the adverse reactions found; for which we decided to study the direct effect of methotrexate on erythrocyte rheology in vitro, using blood from healthy donors that were

divided in 5 aliquots: one was control and the other were treated, with methotrexat in increasing concentrations (0.5, 0.75, 1 y 5  $\mu$ M; n: 5, each group).

Cell morphology was estimated by light microscope; Rigidity index (RI) by filtration; Osmotic fragility (measured photometrically at 540 nm) was determined through  $X_{50}$  value (NaCl mM concentration yielding 50% hemolysis) and the degree of homogeneity of the cell population ( $\beta$ ). Erythrocyte aggregation was quantified by optical densitometry estimating mean size of red cells aggregates (T) and initial velocity of process (V). There was no alteration of erythrocyte aggregation neither in T nor in V.

Presence of methotrexat in incubation medium increased RI, the osmotic fragility (higher  $X_{50}$ ) as well as heterogeneity of the population ( $\beta$ ) response to hyposmolarity in higher methotrexate doses. The former effects added to stomatocytosis and erythrocyte deformability could be related with the anemia in patients under methotrexate treatment. In erythrocyte aggregation, although the size and speed of the aggregates do not increase in presence of the drug, it would be expected that when the rigid erythrocytes enter the capillaries could give time to the formation of aggregates that difficult circulation. and promote the destruction of red blood cells. To mitigate these side effects of treatment with methotrexate, periodic control of the full blood count, clinical monitoring would be recommended to detect the appearance of these situations early, and above all choose a treatment with a personalized dose of methotrexate for each patient. To mitigate these side effects of treatment with methotrexate, periodic control of the complete blood count, clinical control to detect the appearance of these situations early, and mainly treatment with a dose of methotrexate personalized for each patient, would be recommended.

**Key words: Methotrexate. Rheumatoid arthritis. Anemia. Red cell rheology.**

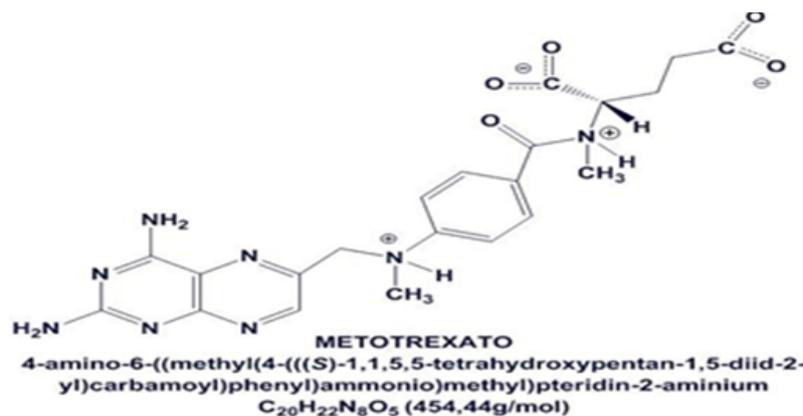
## Introducción

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se demostró que la viscosidad sanguínea estaba aumentada en pacientes con Artritis Reumatoidea (AR) debido a la pérdida de deformabilidad de los eritrocitos, la cual se estimó a través del índice de rigidez de la membrana eritrocitaria incrementado, asociado a una pérdida de la fluidez de membrana que fue medido por marcadores de spin (1). Esto podría evidenciar un daño de la membrana celular que se expresa a través de una deformabilidad alterada de los eritrocitos, lo que convierte a los parámetros hemorreológicos en herramientas fiables para estudiar la evolución de la enfermedad.

Posteriormente se estudiaron los factores celulares y plasmáticos que afectan la agregación eritrocitaria en pacientes con AR. Los resultados obtenidos han demostrado que los factores plasmáticos, concentración de inmunoglobulinas y fibrinógeno en particular, fueron los determinantes del aumento de la agregación, dado que el factor celular alterado, índice de rigidez (IR), produjo disminución del proceso tanto en velocidad como en tamaño de los agregados. Asimismo, se mostró que los pacientes con AR presentan una agregación eritrocitaria (AE) aumentada, cuyo valor se modificó junto con el índice de actividad DAS 28-4, (2,3) convirtiéndose así esta variable hemorreológica en un indicador de actividad de la AR. Entre los medicamentos utilizados para el tratamiento prolongado de AR de los pacientes se encuentra el metotrexato (MTX) (4).

Estas alteraciones observadas de la reología eritrocitaria en AR, no permitía esclarecer si la modificación de los parámetros hemorreológicos se debía exclusivamente a las alteraciones propias de la patología inflamatoria o también a acciones del tratamiento prolongado con mtx empleado en dichos pacientes (5) o a ambas.

El mtx es uno de los fármacos más utilizados en la terapéutica de cáncer y enfermedades autoinmunes, siendo además la primera opción en el tratamiento de la artritis reumatoide (concentraciones séricas máximas de 0,1 a 2  $\mu$ M) (6). El mtx es considerado un fármaco antimetabolito antiinflamatorio no esteroideo.



**Figura 1:** Estructura química del metotrexato

En la figura 1 se observa la estructura química del metotrexato. Es una mezcla conteniendo 85% (calculado sobre una base anhidra) de ácido 4-amino-10-metilfólico y pequeñas cantidades de compuestos estrechamente relacionados. Desde un punto de vista estructural, metotrexato difiere del ácido fólico en la sustitución de un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) por un grupo hidroxilo (-OH) en el núcleo de pteridina; y la adición de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) sobre los nitrógenos amínicos de los grupos pterilo y benzoilo.

El mtx es empleado en el tratamiento de la AR con baja toxicidad y buena tolerancia (6). Entre las reacciones adversas encontradas (7), presentes en las personas que toman el mtx, por padecer AR, está la anemia (8,9). No está claro el papel que desempeña la reología eritrocitaria en su desarrollo, por lo que, decidimos estudiar la acción directa del mtx sobre la misma.

## Objetivo

Estudiar la acción directa del mtx a distintas dosis sobre la reología eritrocitaria (forma, deformabilidad, fragilidad osmótica y agregación eritrocitaria).

## Material y métodos

Se utilizó sangre de donantes voluntarios. Los criterios de inclusión considerados fueron hombres voluntarios sanos no fumadores, con una edad (media: 43 ± 0,22 años, con un rango de 31 a 62 años), solicitándoles previamente su consentimiento por escrito, de acuerdo con la declaración de los principios éticos de Helsinki (10). Se excluyeron los donantes con enfermedades cardiovasculares o hepáticas, cáncer, enfermedades infecciosas crónicas, serología VIH positivo o diabetes mellitus, así como los fumadores empedernidos (>20 cigarrillos/día) y aquellos que estuvieran bajo medicación que pudiera alterar las propiedades hemorreológicas de la sangre.

Las muestras de sangre se obtuvieron por extracción venosa de donantes sanos voluntarios, las mismas fueron anticoaguladas con EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) y se usaron dentro de las cuatro horas de realizada la extracción.

Cada muestra se fraccionó en 5 partes, una se usó como control (C) y a las restantes se les agregó concentraciones crecientes de mtx (0,5; 0,75; 1 y 5 μM). Los glóbulos rojos de la muestra usadas como control y diferentes concentraciones de mtx, fueron obtenidos por centrifugación a 5000 RPM y resuspendidos al 40% de hematocrito, en su propio plasma. Todas las alícuotas se incubaron 120 minutos a 37°C (11) y en ellas se realizaron:

### 1 - Determinaciones bioquímicas:

- 1.1. Hematocrito (*Hto*) por micrométodo.
- 1.2. Contaje de glóbulos rojos manual, en cámara de Newbauer.
- 1.3. Concentración de hemoglobina (Hb) por método colorimétrico de la cianmetahemoglobina (12).
- 1.4. Volumen corpuscular medio (VCM) se calcula como:  $\frac{Hto (\%) \times 10}{\text{Número de eritrocitos (millones por mm}^3\text{de sangre)}}$

- 1.5. Concentración de Hb corpuscular media (CHbCM) se calcula como :  $\frac{Hb (gr \times 100ml) \times 100}{Hematocrito (\%)}$
- 1.6. Forma Celular: la forma celular se realizó por microscopía directa de alícuotas de sangre completa. El número de células observadas fue de 150 por cada alícuota y se realizó el cálculo del Índice Morfológico (IM =  $\frac{\text{[índice de forma} \times \text{n}^\circ \text{ de células}]}{\text{n}^\circ \text{ total de células}}$ ) Expresado como: Discocito (0), Estomatocito I (-1) Estomatocito II (-2), Estomatocito III (-3), Esfero-estomatocito (-4) (13).
- 1.7. Fragilidad osmótica: se incubaron las muestras durante 30 minutos en concentraciones crecientes de NaCl (De 0 a 290 mOsm). Los porcentajes de hemólisis se determinaron por fotocolorimetría (14). Se representó en una gráfica el % de hemólisis en función de la concentración de NaCl, y se calcularon los parámetros: X50 ([NaCl] que produce 50 % de hemólisis) y  $\beta$  (homogeneidad de la población eritrocitaria).

## 2 - Determinaciones hemorreológicas:

- 2.1. Índice de rigidez (IR), inversa de la deformabilidad eritrocitaria, se midió por el método de filtración (15) por membranas de policarbonato en un aparato automatizado. Con este método, la sangre entera de pacientes y controles se centrifugó a 5000 RPM durante 5 minutos, el plasma y la capa leucocitaria fueron separados y los eritrocitos se lavaron dos veces con buffer fosfato isotónico. Los glóbulos rojos lavados (1 ml) se volvieron a suspender en buffer fosfato isotónico con albúmina bovina (9 ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) para conservar la forma del eritrocito, obteniendo un hematocrito del 10%. Luego, se pasó la suspensión de eritrocitos a través de un filtro de policarbonato, con 5 micrómetros de tamaño de poro (Nucleopore Corp. USA), usando una presión de filtración negativa de 10 cm H<sub>2</sub>O. El tiempo de flujo requerido para que un 1 ml de suspensión de eritrocitos pase a través del filtro se midió en las muestras de sangre con y sin tratamiento sangre de mtx. Los resultados se expresaron como un índice de rigidez (IR) que es una estimación de la deformabilidad eritrocitaria (16), definido como:  $IR = \frac{(T_b - T_s)}{(T_s)} \times 100 / Hto$ . Donde: T<sub>b</sub>: tiempo de paso de la suspensión celular a través del filtro; T<sub>s</sub>: tiempo de paso de un volumen igual de buffer fosfato isotónico; Hto: hematocrito (10%). Las medidas de deformabilidad de eritrocitos están en conformidad con el Comité Internacional de Normalización en Hematología (17).
- 2.2. Agregación eritrocitaria (AE): se realizaron las mediciones con un agregómetro, instrumento que consta de un sistema mecánico que agita la muestra de sangre a una velocidad media controlada de 560 seg<sup>-1</sup> para obtener una desagregación completa. Luego de una abrupta interrupción de la agitación, el circuito de medición verifica por medio del receptor infrarrojo una gradual disminución en la transmitancia de la luz asociado con la producción de agregados de células rojas. Esta señal es luego amplificada y conectada a la entrada del conversor analógico-digital de la placa de adquisición de datos. Posteriormente, el software los grafica en línea, permitiendo al operador observar a cada instante lo que está sucediendo, en forma cuantitativa y gráfica. Del análisis de la curva se determinan dos parámetros del proceso de AE: SONO que estima el tamaño promedio de los agregados (T), y 2K2NO que estima la velocidad inicial del proceso (V) (18,19). Los datos de las determinaciones de forma, deformabilidad y fragilidad osmótica eritrocitaria se presentaron como media  $\pm$  desvío standard. Las comparaciones entre grupos fueron analizadas aplicando la t de Student para grupos no apareados. Los datos de AE son presentados como mediana y rango, y analizados con test no paramétrico de Kruskal-Wallis para datos apareados (20). Se consideró diferencia estadística sólo cuando p fue menor a 0,05 (p<0,05).

## Resultados

En primera instancia se investigó el efecto del mtx (a dosis menores de 1  $\mu$ M y a 5  $\mu$ M) sobre la forma (IM) y la deformabilidad eritrocitaria (IR).

**TABLA 1A.** Hto, Hb, conteo de glóbulos rojos, Índice de rigidez, Índice Morfológico, Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media y Volumen Corpuscular Medio.

	Control	mtx 0,5 $\mu$ M	mtx 0,75 $\mu$ M	mtx 1 $\mu$ M	mtx 5 $\mu$ M
Hto (%)	40 $\pm$ 2	39 $\pm$ 1	39 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1**
Hb g/dl	12,97 $\pm$ 0,08	12,62 $\pm$ 0,07	12,71 $\pm$ 0,06	12,62 $\pm$ 0,08	11,83 $\pm$ 0,07**
millones/mm <sup>3</sup>	4,418 $\pm$ 0,045	4,348 $\pm$ 0,032*	4,348 $\pm$ 0,033*	4,358 $\pm$ 0,035*	4,487 $\pm$ 0,042**
CHBCM g/dl	32,67 $\pm$ 0,02	32,37 $\pm$ 0,01	32,59 $\pm$ 0,02	32,37 $\pm$ 0,02	32,87 $\pm$ 0,03
IR (%)	7,37 $\pm$ 0,78	7,65 $\pm$ 0,90	13,67 $\pm$ 1,98**	11,50 $\pm$ 1,01 *	6,25 $\pm$ 0,67**.
IM	-0,03 $\pm$ 0,03	-0,016 $\pm$ 0,148	- 0,127 $\pm$ 0,093	-0,134 $\pm$ 0,043	-0,337 $\pm$ 0,099*
VCM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	90,52 $\pm$ 0,5	89,70 $\pm$ 0,35	89,68 $\pm$ 0,35	89,48 $\pm$ 0,37	80,22 $\pm$ 0,43**

Los valores se expresan como media  $\pm$  desvío estándar. Se consideran significativamente diferentes del grupo de control (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 respecto de C). Referencias: IR: índice de rigidez, IM: índice morfológico, VCM: volumen corpuscular medio.

Como se observa en la Tabla 1A, los valores de VCM y del IM no presentaron cambios significativos en las muestras con concentraciones de mtx de 0,5, 0,75 y 1  $\mu$ M en comparación a los valores controles, a excepción de 5  $\mu$ M donde disminuyeron significativamente. Las muestras con concentraciones de mtx de 0,75 y 1  $\mu$ M en comparación a los valores controles mostraron un aumento significativo del IR, a diferencia de lo que se observa en la máxima concentración (5  $\mu$ M) donde descendió significativamente. La concentración de hemoglobina corpuscular media no se modificó en las distintas dosis respecto del control.

En una segunda instancia se estudió el efecto del mtx sobre la fragilidad osmótica eritrocitaria

**TABLA 1B.** Parámetros de Fragilidad Osmótica Eritrocitaria

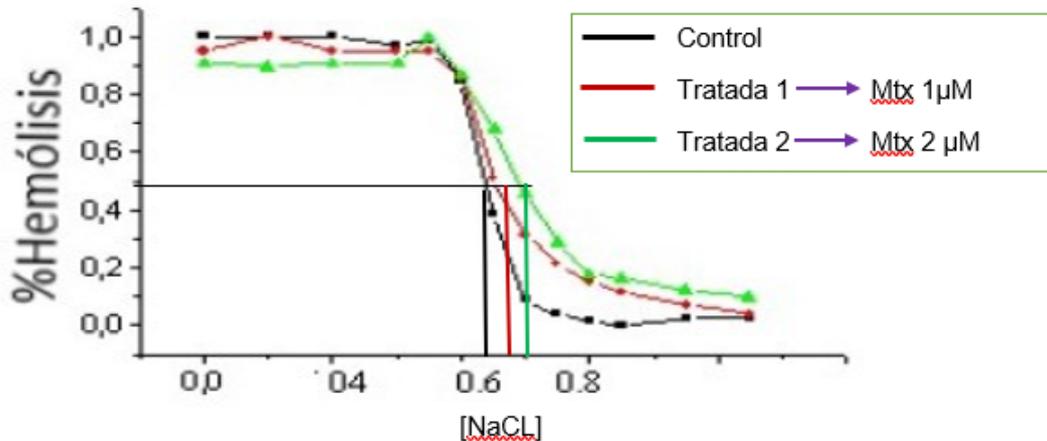
	Control	mtx 0,5 $\mu$ M	mtx 0,75 $\mu$ M	mtx 1 $\mu$ M	mtx 5 $\mu$ M
X <sub>50</sub>	0,64 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,03*	0,71 $\pm$ 0,03**
B	4,97 $\pm$ 0,02	4,87 $\pm$ 0,02	4,89 $\pm$ 0,01	3,35 $\pm$ 0,01**	2,88 $\pm$ 0,05*

Los valores se expresan como media  $\pm$  desvío estándar. Se consideran significativamente diferentes del grupo control (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 respecto de C). Referencias: X<sub>50</sub>: [NaCl de 0 a 1 osmolar] que produce 50 % de hemólisis y  $\beta$ : homogeneidad de la población eritrocitaria.

Como se observa en la Tabla 1B, la presencia de mtx en el medio de incubación a las concentraciones de 1 y 5  $\mu$ M, aumentó X<sub>50</sub> y disminuyó  $\beta$  frente a la hiposmolaridad del medio.

La presencia de mtx en el medio de incubación aumentó la fragilidad osmótica (mayor X<sub>50</sub>) e incrementó la heterogeneidad de la respuesta poblacional a la hiposmolaridad en las dosis de 1 y 5  $\mu$ M

En el gráfico (Figura 2) se muestran las curvas correspondientes a las concentraciones 1  $\mu$ M de mtx (tratada 1) y 5  $\mu$ M de mtx (tratada 2), con las cuales se observaron diferencias significativas respecto al grupo control.



**Figura 2:** Curvas de fragilidad osmótica eritrocitaria. La gráfica representa el % de hemólisis en función de la concentración de NaCl (0 a 1 Osmolar). 1  $\mu$ M de mtx (tratada 1;  $p < 0,05$ ) y 5  $\mu$ M de mtx (tratada 2;  $p < 0,01$ ).

Finalmente se decidió estudiar la capacidad de agregarse de los eritrocitos (Tabla 2). Como se observa en la tabla 2, el T y la V, no se incrementaron en presencia de distintas concentraciones de mtx en comparación a los valores controles.

**TABLA 2.** Parámetros de agregación de eritrocitos en muestras de mtx a distintas concentraciones y controles.

	Control	mtx 0,5 $\mu$ M	mtx 0,75 $\mu$ M	mtx 1 $\mu$ M	mtx 5 $\mu$ M
T	1,925 (1,74-1,99)	1,94 (1,40-1,99)	1,945 (1,88-2,0)	1,94 (1,88-1,98)	1,92 (1,88-1,99)
V	0,725 (0,42-1,66)	0,50 (0,16-1,04) *	0,53 (0,15-1,09) *	0,715 (0,200-1,12) <sup>ns</sup>	0,62 (0,20-1,94) <sup>ns</sup>

Los valores se expresan como mediana  $\pm$  rango, apareados. (\* $p < 0,05$  respecto de C, <sup>ns</sup> no significativo). Referencias: T: Tamaño de los agregados y V: velocidad

## Discusión

En nuestros experimentos, la presencia de mtx en el medio de incubación (suero autólogo) disminuyó la deformabilidad eritrocitaria (estimada por el IR) en las dosis menores a 1  $\mu$ M. Esto mostraría concordancia con el aumento del índice de rigidez considerando que en esas condiciones el glóbulo rojo se torna menos deformable y dificulta su paso a través de membranas nucleopore de menor diámetro que los propios eritrocitos normales, aumentando consecuentemente el tiempo necesario para su traspaso. Estos resultados estarían en coincidencia con otros autores que demostraron alteraciones de las propiedades mecánicas de los eritrocitos en presencia de mtx midiendo propiedades viscoelásticas celulares (21).

La deformabilidad eritrocitaria está influenciada por la viscosidad del citoplasma y la forma de disco bicóncavo del glóbulo rojo (22). La viscosidad del citoplasma está regulada por el contenido de hemoglobina celular estimada por la concentración de hemoglobina corpuscular media (23). En nuestros experimentos realizados con muestras de sangre adicionadas con distintas concentraciones de mtx comparadas con la que no contenía mtx, la CHbCM no sufrió modificaciones significativas.

En cuanto a la forma de disco bicóncavo del glóbulo rojo se observó que en la incubación de los eritrocitos con una dosis de mtx mayor a 5  $\mu$ M, se aumentó la curvatura negativa de la membrana del eritrocito, transformando su morfología normal de disco bicóncavo en estomatocito. Los resultados obtenidos demostraron que el mtx alteró la forma eritrocitaria, en coincidencia con otros autores que demostraron cambios morfológicos de las células inducidos por mtx y que se visualizaron mediante imágenes observadas por microscopía óptica y de fluorescencia (21,23).

La forma de disco bicóncavo proporciona una relación óptima superficie/volumen que le permite atravesar capilares estrechos contribuyendo a las condiciones de flujo. Al perder volumen el eritrocito adquiere forma esférica y se torna muy difícil de deformar (24). Se observó que a dosis mayores de 0,5  $\mu\text{M}$  de mtx disminuyó el VCM de los eritrocitos y su capacidad de deformarse (estimada por un mayor valor de IR). A la máxima concentración (5  $\mu\text{M}$ ) se observó una disminución del IR por la disminución del volumen eritrocitario (esfero -estomatocitos) que atravesó fácilmente el filtro de policarbonato.

La disminución de volumen corpuscular medio coincidió con la disminución observada en los pacientes con AR estudiado recientemente (25). Estos resultados estarían en concordancia con otros autores que proponen que la anemia causada por mtx es el más significativo factor pronóstico durante el período de tratamiento de la AR (23,25). En estudios realizados en ratas, observan que el tratamiento con mtx produce una disminución del VCM sin cambios en la CHbCM, induciendo una anemia microcítica (7). Estas modificaciones podrían ser factores coadyuvantes de la anemia encontrada en los pacientes tratados con dicho fármaco.

Otro aspecto para considerar como efecto del mtx sobre la reología eritrocitaria es la resistencia de esas células a la lisis. Cuando los glóbulos rojos se encuentran en un medio hipotónico (concentración menor a la fisiológica de 290 mosm/kg) el gradiente osmótico entre el medio y el citoplasma celular genera un movimiento neto de agua libre hacia el interior celular. Dependiendo de la capacidad de la membrana para mantener su integridad, el eritrocito se hincha y estalla permitiendo la salida de hemoglobina a un dado nivel de hipotonicidad. El nivel de hipotonicidad que produce la lisis permite evaluar la resistencia y estabilidad de la membrana del eritrocito frente al estrés osmótico (26,27).

Este efecto sumado a la estomatocitosis, y la menor deformabilidad pueden generar una mayor fragilidad osmótica que se relaciona con la anemia encontrada en los pacientes tratados con dicho fármaco.

El mtx no alteró significativamente el tamaño de los agregados (T). A concentraciones menores de 1  $\mu\text{M}$ , disminuyó la velocidad de agregación (V) además de provocar rigidez en los eritrocitos (mtx 0,75  $\mu\text{M}$ ), sin embargo, con concentraciones de 1 y 5  $\mu\text{M}$  la velocidad de agregación no se modificó.

Para atenuar estos efectos secundarios al tratamiento con MTX sería recomendable el control periódico del hemograma completo, el control clínico para detectar la aparición de estas situaciones en forma temprana y principalmente hacer un tratamiento con dosis de metotrexato personalizada para cada paciente.

## Conclusiones

El MTX altera las propiedades reológicas de los eritrocitos, en particular, modifican las propiedades viscoelásticas de los mismos y al volverse más rígidos podrían justificar la anemia que se produce en los pacientes con AR tratados con dicho fármaco.

La forma de disco bicóncavo modificada a estomatocito de los eritrocitos, estrechamente relacionada a la disminución de la deformabilidad de los mismos, dificultaría el paso de estos a través de los capilares, lo que adicionado al aumento de la fragilidad osmótica eritrocitaria favorecería la destrucción de esas células.

En cuanto a la agregación de los eritrocitos, si bien el tamaño de los agregados no se incrementa en presencia del MTX ni se acelera el proceso de formación de estos, sería esperable que la dificultad de los eritrocitos con deformabilidad disminuida para ingresar en los capilares pudiera dar tiempo a la formación de agregados que obstaculizarían la circulación, favoreciendo la destrucción de los glóbulos rojos.

Para atenuar los efectos secundarios al tratamiento con MTX sería recomendable el control periódico del hemograma completo, el control clínico para detectar la aparición de estas situaciones en forma temprana y principalmente hacer un tratamiento con dosis de MTX personalizada para cada paciente.

**Agradecimientos:** Facultad de Ciencias Médicas, Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (Argentina).

**Fuente de financiamiento:** Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación. Facultad de Ciencias Médicas, Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (Argentina).

## Referencias Bibliográficas

1. Luquita A, Urli L, Dominighini A, Svetaz MJ, et al. Haemorheological variables as a rheumatoid arthritis activity indicator. Clin Hemorheol Microcirc. 2004;30(1):9-16.

2. Luquita A, Urli L, Svetaz MJ, et al. Erythrocyte aggregation in rheumatoid arthritis: cell and plasma factor's role. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009; 41: 49-56.
3. Van der Heijde DM, Jacobs J., The original "DAS" and the "DAS28" are not interchangeable. Comment on the articles by Prevo et al., *Arthritis Rheum.* 1998; 41(5): 942-945.
4. Van Gestel AM, Haagsma CJ Van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joints counts, *Arthritis Rheum.*1998;41(10): 1845-1850.
5. Elert-Kopeć S, Tlustochowicz M, Załucka L, et al. Concentration of methotrexate in red blood cells and its relevance for disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatologia* 2013; 5(5):370-374.
6. Katchamart W, Trudeau J, Phumethum V, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate (MTX) monotherapy versus MTX combination therapy with non-biological disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(7): 1105-12.
7. Kojima S, Yoshida T, Sasaki J, et al. Induction of hyperchromic microcytic anaemia by repeated oral administration of methotrexate in rats. *J. Toxicol. Sci.* 2012; 37(5):957-68.
8. Ernst E, Thies W, Matrai A et al. Hemorheologic abnormalities in chronic arthritis. *Clin Hemorheol.* 1987; 7: 591-8.
9. Luquita A, Gennaro AM, Rasia M. Effects of subnormal hemoglobin concentration on the deformability of normocytic erythrocytes. *Clin Hemorheol.*1996; 16:117-27.
10. World Medical Association 52nd General Assembly. The International Response to Helsinki VI - The WMA's Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Edinburgh, Scotland, October 2000.
11. Martino M, Urli L, Svetaz, MJ, Luquita A, Rasia M. In vitro effect of different methotrexate concentrations on erythrocyte osmotic resistance. *Biocell* 2011;35(2): A155.
12. Van Kampen EJ, Zijlstra W. Standardization of hemoglobinometry. The hemoglobincyanide method. *Clin Chim Acta* 1961; 6: 538-544.
13. Bessis M. Red cell shapes: An illustrated classification and its rationale. In: Bessis M., Weed R.I., Leblond P.F., editors. *Red Cell Shape: Physiology, Pathology, and Ultrastructure.* Heidelberg, Germany: Springer; 1973. p.1-24.
14. Dacie JV, Lewis SM. *Hematología Práctica, Segunda. Edición, VI. Ed.* Barcelona: Toray, S.A. 1970. p 40-70.
15. Reid HL, Barnes AJ, Lock PJ, et al. A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J. Clin Pathol.* 1976; 29: 855-8.
16. Jones JG, Adams RA, Evans SA: Bulk filtration through micropore membranes for analysing blood cell rheology in clinical research. *Clin Hemorheol* 1994; 14:149-69.
17. International Committee for Standardization in Haematology: Expert panel on blood rheology. *Clin Hemorheol* 1986; 6:439-52.
18. Bollini A, Rasia M, Toro R, et al. Instrumento para medición de agregación eritrocitaria. *Rev. argent. Bioing* 2000; 6:54-70.
19. Bertoluzzo SM, Bollini A, Rasia M, et al. Kinetic model of erythrocyte aggregation. *Blood Cell Mol Dis.* 1999; 25(22): 339-42.
20. Núñez-Colín CA. Nonparametric analysis of variance: A point of view in favour to use it. *Acta agrícola y pecuaria* 2018; 4 (3):69-79.
21. Li M, Liu L, Xiao X, et al. Effects of methotrexate on the viscoelastic properties of single cells probed by atomic force microscopy. *J Biol Phys* 2016; 42: 551-569.
22. Mohandas N, Chasis JA, Shohet S. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape. *Sem. in Hemat.* 1983; 20:225-242.
23. Held J, Mosheimer-Feistritzer B, Gruber J, et al. Methotrexate therapy impacts on red cell distribution width and its predictive value for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2018; 2: 6.
24. Namvar A, Blanch AJ, Dixon MW, Carmo OMS, Liu B, Tiash S, Looker O, Andrew D, Chan LJ, Tham WH, Lee PVS, Rajagopal V, Tilley L. Surface area-to-volume ratio, not cellular viscoelasticity, is the major determinant of red blood cell traversal through small channels. *Cell Microbiol.* 2021; 23(1):e13270. doi: 10.1111/cmi.13270.
25. Shipa M, Yeoh S, Mukerjee D, Ehrenstein M. An Increase in Red Cell Mean Corpuscular Volume by Methotrexate Is Potentiated by Hydroxychloroquine and Predicts Clinical Response in Rheumatoid Arthritis *Arthritis Rheumatol.* 2020; 72 (suppl 10): [abstract 1240].
26. Siddonabc AJ, Tormeyab In CA. The chemical and laboratory investigation of hemolysis. In: *Advances in Clinical Chemistry.* 2019, 89, (6):215-258.
27. Singh, S., Ponnappan, N., Verma, A. et al. Osmotic tolerance of avian erythrocytes to complete hemolysis in solute free water. *Sci Rep* 9, 7976 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44487-7>