



***“EFECTIVIDAD DEL RITUXIMAB EN LA
ARTRITIS REUMATOIDE”***

**TRABAJO DE GRADUACION PREVIA A LA OBTENCION
DE TITULO DE MEDICO**

AUTOR: JOSE LUIS AGUILERA HEREDIA

DIRECTOR: DRA MARIA DEL CARMEN OCHOA

ASESOR ESTADISTICO: DRA MARIANA GAYBOR

CUENCA, ECUADOR

Octubre, 2013

Efectividad del Rituximab en la Artritis Reumatoide

Aguilera, Jose¹, Ochoa, Maria², Gaybor, Mariana³

1. Facultad de Medicina, Universidad del Azuay

2,3. Hospital José Carrasco Arteaga

E-mail:

AJ: ua043794@uazuay.edu.ec

Dirección para entrega de Correo:

Avenida 12 de Octubre y Autopista Cuenca-Azogues

Cuenca, Ecuador.

Teléfono:

(593) 7 4090342

(593) 99 5973297

Octubre, 2013

RESUMEN

Introducción: Este estudio evaluó si el Rituximab es efectivo en la Artritis Reumatoide, como medicamento de segunda línea a fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad y biológicos de primera línea, medido por escalas para la valoración de la Artritis Reumatoide más usadas.

Métodos: Ingresaron al estudio 40 pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide en el periodo Enero 2012 y Febrero 2013, derivados del Comité de Medicamentos Biológicos del Hospital José Carrasco Arteaga”, todos los pacientes habían tenido falla al tratamiento con al menos 1 medicamento antirreumático modificador de la enfermedad o a un fármaco biológico o tener contraindicaciones para este. Se administró 1000mg de Rituximab IV con un intervalo de dos semanas; Se compararon las escalas del DAS 28 (*Disease Activity Score 28*), EULAR (*European League Against Rheumatism*) y HAQ 20 (*Health Assessment Questionnaire*) en la primera infusión y después de 2 y 4 meses, se utilizó estadística descriptiva y el test de de los rangos con signo de Wilcoxon para el análisis de los datos.

Resultados: Al final del seguimiento 40 pacientes fueron incluidos en el análisis, la media del DAS28 inicial, de los 2 y 4 meses fue 5.04, 4.12 y 4.44 respectivamente; hubo una mejoría estadísticamente significativa entre el DAS 28 inicial y el de los 4 meses ($p < 0.05$) usando la test de los rangos con signo de Wilcoxon. La media del HAQ20 inicial fue 1.39, a los 2 meses 1.14 y a los 4 meses 1.13. Según los criterios de EULAR 7 (17.5%) pacientes alcanzaron una buena respuesta, 5 (12.5%) moderada y 28 (70%) no respuesta. 5 pacientes alcanzaron remisión de la enfermedad según EULAR.

Conclusiones: El uso de Rituximab como medicamento de segunda línea para la Artritis Reumatoide mostro diferencias estadísticamente significativas en las escalas del DAS28, HAQ 20 y criterios de EULAR, sin embargo la mejoría clínica es pequeña.

Palabras Clave: *Rituximab, Artritis, Reumatoide, DAS28, HAQ20*

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF RITUXIMAB IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Introduction: This study evaluated whether Rituximab is effective in Rheumatoid Arthritis as a second-line disease-modifying anti-rheumatic drug, and first-line biological modifier, measured with the most commonly used scales for the assessment of Rheumatoid Arthritis.


Methods: 40 patients diagnosed with Rheumatoid Arthritis during January 2012 to February 2013, and who were referred by the Committee for Biological Medicinal Products of "José Carrasco Arteaga" Hospital, were admitted to the study. All patients had treatment failure with at least one disease modifying anti-rheumatic drug or a biologic drug, or for having contraindications for this. 1000mg of Rituximab IV was administered within a two-week interval. The first infusion of Disease Activity Score 28 (DAS 28), European League Against Rheumatism (EULAR), and Health Assessment Questionnaire (20 HAQ) Scales were compared; and after a 2 to 4 months period, descriptive statistics and Wilcoxon signed-rank test were used for the data analysis.

Results: At the end of the follow-up, 40 patients were included in the analysis. The 2 months and 4 months initial measure of DAS28 was 5.04, 4.12 and 4.44 respectively. There was a statistically significant improvement between DAS 28 and the one for the 4 months period ($p < 0.05$) by using the Wilcoxon signed-rank test. The initial HAQ20 measurement was 1.39, at 2 months 1.14, and at 4 months 1.13. According to EULAR 7 criteria (17.5%) patients achieved a good response, 5 (12.5%) moderate response, and 28 (70%) no response. 5 patients achieved remission by EULAR.

Conclusions: The use of Rituximab as a second-line drug for Rheumatoid Arthritis showed statistically significant differences in the DAS28, HAQ 20 scales, and EULAR criteria; however, clinical improvement is insignificant.

Key Words: Rituximab, Arthritis, Rheumatoid, DAS28, HAQ20




Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INTRODUCCION

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune común que se asocia a una alta morbilidad además de elevados costos económicos. (1) La prevalencia mundial oscila entre el 0,2% y 2,1%, con un promedio de 0,8 por ciento. La relación que existe entre hombres y mujeres es de 1:3. Muchos aspectos de su fisiopatología se desconozcan lo que ha hecho que su tratamiento se encuentre bajo constante investigación. (1-2)

El tratamiento de primera línea para la mayoría de pacientes con AR son los Fármacos Antirreumáticos Modificadores de Enfermedad (Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs o DMARDs), el siguiente paso es la adición de un fármaco biológico Anti-TNF como el Infliximab o Etanercept; El Rituximab está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en la AR en pacientes con enfermedad activa, quienes no han respondido al tratamiento con DMARDs y al menos 1 fármaco biológico Anti-TNF. Debido al alto costo, efectos adversos, contraindicaciones o administración frecuente de los fármacos Anti-TNF en ocasiones se elige como terapia biológica de primera línea al Rituximab asociado a Metotrexate. (2,4,8,9)

El Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 desarrollado por ingeniería genética. CD20 es un antígeno de superficie que se encuentra en las células pre-B y en los linfocitos B maduros, no está presente en las células madre ni en las células plasmáticas, por eso Rituximab causa una depleción selectiva de la subpoblación de células B CD20 positivo; el objetivo de esta depleción es retirar los clones de células B que producen los auto-anticuerpos responsables de la enfermedad. (6,7)

Ensayos clínicos aleatorizados han demostrado la eficacia del Rituximab mejorando los síntomas de la AR con la medición de las escalas del DAS 28 (Disease Activity Score 28), EULAR (European League Against Rheumatism), y ACR (American Collegue of Rheumatology). (10-13)

Los siguientes dos ensayos clínicos aleatorizados son los principales estudios que demostraron la eficacia del Rituximab en la AR:

El primer estudio involucró a 161 pacientes con AR activa que recibían mínimo 10mg de Metotrexate, a quienes se les asignó a una de las cuatro intervenciones: Ningún medicamento y continuar Metotrexate, administrar Rituximab y retirar Metotrexate, administrar Rituximab y continuar Metotrexate, y administrar Rituximab más Ciclofosfamida y descontinuar Metotrexate. El resumen de los resultados es el siguiente: La proporción de pacientes en alcanzar un ACR20 al final de los 6 meses fue 38%, 65%, 73% y 76% en el grupo control y los tres grupos de Rituximab respectivamente; una respuesta moderada a buena según los criterios de EULAR ocurrió en 83% a 85% en los pacientes tratados con Rituximab comparado con 50% del grupo control. (10)

El segundo estudio, conocido como el estudio REFLEX, aleatoriamente asignó a 520 pacientes a Rituximab dos infusiones de 1000mg con una semana de separación o placebo. Los resultados mostraron los siguiente, Rituximab vs

Control: ACR20 51% vs 18%, ACR50 27% vs 5%, ACR70 12% vs 1%, moderada a buena respuesta según EULAR 65% vs 22%. (11)

Estos dos ensayos aleatorizados fueron la base para que el Rituximab sea aprobado por la FDA (Foods and Drugs Administration) en Estados Unidos y por el *Committee for Medicinal Products for Human Use* en Europa para el tratamiento de AR moderada a severa en pacientes que no ha respondido a terapia Anti-TNF, el régimen aprobado y usado en la mayoría de centros es de Rituximab dos infusiones 1000 mg separado por dos semanas, puede ser usado como monoterapia o combinado con Metotrexate. (10-11)

En el 2008 el GLADAR (Grupo Latino Americano de Estudio de Artritis Reumatoidea) y PANLAR (Pan American League of Associations of Rheumatology) publicaron el primer artículo Latino Americano con respecto al tratamiento de la AR en el contexto de esta región, en el cual recomiendan el uso de Rituximab en pacientes con enfermedad activa (DAS 28 > 3.2), factor reumatoide positivo y en quienes han tenido una respuesta inadecuada o intolerancia a fármacos Anti-TNF; también se puede considerar el uso de Rituximab en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada o intolerancia más de un DMARD que no puede recibir medicamentos Anti-TNF (por contraindicaciones o no disponibilidad). (14)

El número de pacientes tratados por AR en el Hospital José Carrasco Arteaga (HJCA) ha incrementado así como el uso de fármacos biológicos. Actualmente el Rituximab se usa como fármaco biológico de segunda línea en pacientes que han tenido mala respuesta con los DMARDs y al menos un fármaco biológico de primera línea, o que tenga contraindicaciones para estos, razón por la cual es de mucha importancia conocer la respuesta de los pacientes que reciben este fármaco en el hospital; al no haber estudios locales deseamos realizar esta investigación para ver los efectos del Rituximab sobre la actividad de la enfermedad y la calidad de vida de los pacientes, comparando los cambios de las escalas DAS28, nivel de respuesta según criterios de EULAR, y porcentaje de pacientes que alcanzaron remisión al final del seguimiento.

METODOS

El presente es un estudio observacional descriptivo, de una serie de casos seguidos en forma prospectiva entre las fechas de Enero 2012 a Febrero 2013, se llevó a cabo en la Área de Administración de Medicamentos Biológicos del “Hospital José Carrasco Arteaga” de la Ciudad de Cuenca, Ecuador.

Todos los pacientes que fueron seleccionados por el Comité de Medicamentos Biológicos del HJCA y que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión fueron elegidos para formar parte de nuestro estudio, el número de casos durante el periodo de estudio determinó el tamaño de la muestra.

A los pacientes se les administró Rituximab aplicando el protocolo del Comité de Medicamentos Biológicos del HCAM. Los pacientes recibieron 1000mg de Rituximab IV, dos dosis con un intervalo de dos semanas, el medicamento se administró de forma ambulatoria, en el Área de Medicamentos Biológicos del HCAM, con monitorización continua de signos vitales y posibles efectos adversos; tres días antes de cada infusión los pacientes recibieron Loratadina VO 10mg cada 12 horas y Paracetamol VO 500mg cada 8 horas hasta el día de la administración del Rituximab. Todos los pacientes continuaron con su medicación habitual con Metotrexate 7.5 mg VO semanal, Antiinflamatorios no Esteroideos y Acido Fólico.

A cada paciente se les abrió una ficha médica, los datos fueron obtenidos por estudiantes de los últimos año de medicina previamente capacitados por médicos reumatólogos del HJCA, se les aplicó las escalas validadas del DAS28 y HAQ20 antes de la primera infusión y después de 2 y 4 meses. Para el DAS 28 se usó la VSG obtenida en el laboratorio del HJCA, que no tuvo un costo extra por ser parte de los exámenes de rutina de los pacientes con AR.

Los pacientes continuaron su medicación habitual, continuaron con controles por consulta externa de reumatología dos meses después de cada infusión, de ahí fueron remitidos al Área de Biológicos para valorar las escalas mencionadas nuevamente a los 2 y 4 meses.

Se utilizaron los siguientes criterios de inclusión:

- Padecer AR pura, debidamente diagnosticada
- Ser seleccionado por el Comité de Medicamentos Biológicos de dicho hospital, que incluye consentimiento informado para ser parte de investigaciones con fines académicos.
- Falta de respuesta luego de 6 meses de tratamiento con al menos 1 medicamento DMARDs o 1 fármaco biológico de primera línea, o tener contraindicaciones para éste.
- Aceptar voluntariamente que se les realice ficha médica que incluye el DAS 28 y HAQ 20 a los 0, 2 y 4 meses de la primera infusión de Rituximab
- Entender y aceptar el tratamiento

Los criterios de exclusión fueron:

- Tener enfermedad reumatológica autoinmune distinta a AR o enfermedad generalizada significativa secundaria a AR.
- Desarrollar anafilaxia o efectos adversos secundarios a Rituximab que obliguen a suspender el medicamento según los protocolos del hospital
- Pérdida del seguimiento o muerte antes de los 4 meses del seguimiento

41 pacientes fueron elegidos inicialmente para el estudio, 1 paciente desarrollo anafilaxia al momento de la primera infusión, que se resolvió favorablemente; se continuó el estudio con 40 pacientes.

Se creó una base de datos en el software SPSS® con los datos de los pacientes que culminaron el seguimiento, la variables cuantitativas fueron el DAS28 basal, a los dos y 4 meses, HAQ20 basal, a los dos y 4 meses; la variables categóricas fueron respuesta buena, moderada, no respuesta y remisión según los criterios EULAR,

Se obtuvieron medias y desviación estándar para las variables continuas y porcentajes para las variables categóricas. Se utilizó la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon para comparar la media del DAS28 basal con el de los 4 meses, considerando estadísticamente significativo una $p < 0.05$

La efectividad del Rituximab fue valorada por:

- Comparando el DAS 28 basal con el de los 2 y 4 meses
- Nivel de respuesta según criterios EULAR (buena, moderada o ninguna), comparando el DAS28 basal con el de los 4 meses.
- Comparando el resultado del HAQ 20 basal con el de los 2 y 4 meses
- Porcentaje de pacientes que alcanzaron remisión de la enfermedad a los 4 meses definido por los criterios de EULAR

RESULTADOS

En el periodo de reclutamiento fueron elegibles 41 pacientes, de los cuales 1 desarrolló anafilaxia en la primera infusión del Rituximab por lo que se continuó el seguimiento y análisis completo con 40 pacientes.

Los datos demográficos principales de nuestra población están en la (TABLA 1). Todos los pacientes de este estudio habían tenido falla al tratamiento con al menos un DMARDs, falla al tratamiento con un fármaco biológico de primera línea o contraindicación a éste.

TABLA 1. DATOS DEMOGRAFICOS DE LOS PACIENTES*

NUMERO DE PACIENTES	40
MUJERES	36 (90%)
HOMBRES	4 (10%)
EDAD PROMEDIO	53 años (DS 10.8)
DAS 28 PROMEDIO	5 (DS 1.34)

*Todos los pacientes habían tenido falla al tratamiento con al menos un fármaco DMARDs, un biológico de primera línea o contraindicación para este

Con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para comparar las medias del DAS 28 inicial con el final se vio que el tratamiento con Rituximab por 4 meses produjo una mejoría significativa ($p < 0.05$). (TABLA 2.)

TABLA 2. PRUEBA DE LOS RANGOS CON SIGNO DE WILCOXON

RANGOS NEGATIVOS	36 ^a	Z	-4.288
RANGOS POSITIVOS	4 ^b	p	0.00018
EMPATES	0 ^c		

a. DAS28 FINAL < DAS28 BASAL
b. DAS28 FINAL > DAS28 BASAL
c. DAS28 FINAL = DAS28 BASAL

Comparando con la media del DAS 28 inicial (TABLA 3), a los 2 meses hubo una mejoría del 17.6%, mayor de la que se vio a los 4 meses, de 11.6%, la mejoría en los valores del HAQ 20 fue similar a los del DAS28.

TABLA 3. DAS 28 Y HAQ 20 INICIAL, 2 Y 4 MESES

	INICIAL	2 MESES	4 MESES
DAS 28	5.04 (1.34)	4.12 (1.21)	4.42 (1.37)
% MEJORIA	-----	17.66%	11.6%
HAQ 20	1.39 (0.66)	1.14 (0.67)	1.13 (0.69)
% MEJORIA	-----	17.9%	18.7%

Una buena respuesta EULAR a los 2 meses se vio en 11 pacientes (27.5%) y a los 4 meses en 7 (17.5%), respuesta moderada a los 2 y 4 meses fue de 14 (35%) y 5 (12.5%) respectivamente. Ninguna respuesta en 15 (37.5%) pacientes a los 2 meses y 28 (70%) a los 4 meses según EULAR. Al final del seguimiento 4 (10%) pacientes presentaron una remisión de la enfermedad. (TABLA 4)

TABLA 4. RESPUESTA SEGÚN CRITERIOS EULAR

0-2 MESES		
BUENA	11	27,50%
MODERADA	14	35%
NINGUNA	15	37,50%
0-4 MESES		
BUENA	7	17,50%
MODERADA	5	12,50%
NINGUNA	28	70%
REMISION	4	10%

DISCUSION:

En nuestro estudio describimos los principales resultados del uso de Rituximab como fármaco de segunda línea en la AR, es el primer estudio de este tipo en nuestro medio, nuestra hipótesis fue que el Rituximab es efectivo a corto plazo, medido por las escalas principales para la AR, esta hipótesis pudo ser confirmada con los resultados que comparamos el DAS 28 basal con el final, con una p significativa en la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (TABLA 2).

Al comparar la media del DAS 28 inicial con las otras dos mediciones, pudimos observar que hubo una mayor mejoría a los 2 meses que al final de seguimiento (17.6% vs 11.6%), esto no se observó con los resultados del HAQ 20 los cuales son similares a los 2 y 4 meses (TABLA 3); la misma tendencia se observó al ver el nivel mejoría según los criterios de EULAR, donde a los 2 meses más pacientes consiguieron buena respuesta comparando con los 4 meses. El número de pacientes que alcanzó remisión de la enfermedad fue de 4 (TABLA 4). Esta mejoría en los puntajes de DAS28, HAQ 20 y nivel de respuesta de EULAR se puede explicar por la administración de Rituximab; la tendencia de que a los 2 meses comparado con los 4 meses hay mayor mejoría, aunque no es del todo significativa, nos plantea la duda que los efectos benéficos del fármaco son mayores en los primeros dos meses posteriores a la administración de este, y que la duración del efecto no es tan prolongado como se piensa, habrían otros factores que considerar como las limitaciones de nuestro estudio, tolerancia, efectos adversos, costos, etc., para determinar que se debe administrar con mayor frecuencia el medicamento.

Comparando con estudios relevantes como el *REFLEX* (11) que fue un estudio de 24 meses de seguimiento, sin embargo al revisar los resultados vemos que a los 2 y 4 meses hay una mejoría en la media del DAS28 de 1.5 y 1.8 respectivamente, siendo mayor a la de nuestro estudio que es 0.92 y 0.62 respectivamente; en este mismo estudio un 65% de los pacientes alcanzaron respuesta buena o modera según EULAR versus 22% de placebo, comparado con el 40% de nuestro estudio; si bien en nuestro estudio podemos ver que hubo una mejoría estadísticamente significativa en el DAS28 y escalas de valoración para la AR, no llega al nivel de mejoría que se alcanzó en estudios mayores como el *REFLEX* o el publicado en el *NEJM* en el 2004 por *Edwards et al* (10); que son los mayores estudios realizados hasta la fecha sobre Rituximab en la AR.

Si bien se puede observar que el Rituximab mejoro con estadística significativa las escalas de valoración de calidad de vida, no es del todo clínicamente significativa si consideramos que el DAS28 disminuyó solamente 0.92 y 0.62 puntos a los 2 y 4 meses respectivamente; aunque también hay que considerar que la evolución natural de la enfermedad es de empeoramiento progresivo de las escalas de valoración.

Nuestro estudio contó con algunas limitaciones, la AR es una enfermedad infradiagnosticada, además la mayoría de pacientes en tratamiento para le AR reciben otros medicamentos que no son el Rituximab, por esto el número de pacientes que se logró incluir en el periodo de reclutamiento fue pequeño, para

obtener resultados más concluyentes es necesario que se realice un seguimiento por un tiempo más prolongado, otra limitación es el diseño del estudio, al ser descriptivo y no poder comparar con un grupo control o placebo, que por asuntos éticos no fue posible.

Las conclusiones del estudio basado en los resultados principales y comparando con estudios similares es que, el Rituximab es efectivo estadísticamente significativo en el tratamiento de la AR en pacientes que hayan recibido al menos 1 medicamento DMARDs sin respuesta o haber recibido al menos 1 fármaco biológico sin respuesta o tener contraindicaciones para este; siendo posible que la efectividad es mayor a los 2 meses que a los 4 meses, teniendo en cuenta las limitaciones del estudio.

El estudio fue financiado por los autores; los autores no declaran ningún conflicto de interés.

BIBLIOGRAFIA:

1. McInnes I, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
2. Fauci, Braunwald et al. Artritis reumatoide (Cap 314) En: Harrison Principles of Internal Medicine. 17va Edición. Editorial McGraw Hill. Estado Unidos. 2008; Páginas 2083 – 2092
3. Soriano E. R., Galarza-Maldonado C. et al. Use of rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: the Latin American context. *Rheumatology* 2008.
4. O'Dell J. Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2004;350:2591-602.
5. Combe B, Landewe R, Lukas C, et al. EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2007; 66:34.
6. Rituximab (Rituxan) for rheumatoid arthritis. *Med Lett Drugs Ther* 2006; 48:34.
7. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8:140.
8. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 59:762.

9. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:964.
10. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350:2572.
11. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2793.
12. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1390.
13. Mariette X, Kivitz A, Isaacs J, et al. Effectiveness of rituximab + methotrexate in patients with early active rheumatoid arthritis and disease characteristics associated with poor outcomes. *Arthritis Rheum* 2009; 60:S631.
14. E. R. Soriano et al. Use of rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: the Latin American context. *Rheumatology* 2008;47:1097–1099.
15. van Gestel AM, Prevoo ML, van Hof MA, et al. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health

- Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996; 39:34.
16. Smolen J, Aletaha D. Assessment of rheumatoid arthritis activity in clinical trials and clinical practice. UpToDate 2012
17. Purposive sampling. Ch 8 p 155. En Portney LG, Watkins MP, *Foundations of Clinical Research*. Pearson Prentice Hall. 3rd Ed. 2009.
18. Vandembroucke JP, et al. Mejorar la comunicación de estudios observacionales en epidemiología (STROBE): explicación y elaboración. *GacSanit*.2009.doi:10.1016/j.gaceta.2008.12.001