

Polimorfismos en la región promotora del gen del TNF α en artritis reumatoidea.

Clara Isabel González,¹ Olga María Moreno,¹ Diego Luis Saaibi,² William Otero,³ Reynaldo Badillo,³ Javier Martín,⁴ Gerardo Ramírez^{1*}

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia y potencial relevancia de los polimorfismos del gen *TNFA* -308 y -238 en la susceptibilidad y severidad de la artritis reumatoidea (AR). Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en 102 casos con AR y 102 controles sanos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas o alélicas de los polimorfismos analizados cuando se compararon los pacientes con AR y el grupo control. La frecuencia del genotipo *TNFA* -238 GA, mostró una tendencia a la asociación con el inicio tardío de la patología, ≥ 45 años ($p=0,046$) y con ausencia de cirugía. El polimorfismo *TNFA* -308A mostró una tendencia, no significativa estadísticamente, con niveles altos de factor reumatoideo (FR) ($p=0,06$). Las frecuencias genotípicas y alélicas difieren de las reportadas en población antioqueña y son comparables con algunas poblaciones caucásicas. Los resultados de este estudio sugieren que en nuestra población estos polimorfismos están más relacionados con la severidad que con susceptibilidad al desarrollo de la AR. **SaludUIS 2006; 38: 197-203**

Palabras Clave: Artritis reumatoidea (AR), polimorfismos, factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina, factor reumatoideo, susceptibilidad

The aim of this study was to determine the frequency and potential relevance of the *TNFA* gene polymorphisms -308 and -238 in the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (RA). The genotype and allelic frequencies of simple nucleotide polymorphisms (SNPs) were determined in 102 cases with RA and 102 healthy controls. There were not statistically significant differences between the genotype and allele frequencies of the polymorphisms analyzed when the patients were compared with the control group. The frequency of the genotype *TNFA* -238AG, showed a tendency with a late beginning of the pathology, ≥ 45 years ($p=0.046$) and without surgery. The allele *TNFA* -308A showed a not significant statistically tendency, to high levels of rheumatoid factor (RF) ($p=0.06$). The genotype and allelic frequencies differ of those reported in "antioqueña" population and they are comparable with some Caucasian populations. The results of this study suggest that in our population these polymorphisms are more related with the severity that with susceptibility to the development of RA. **SaludUIS 2006; 38: 197-203**

Key Words: Rheumatoid Arthritis (RA), polymorphisms, tumor necrosis factor (TNF), interleukine, rheumatoid factor, susceptibility.

INTRODUCCIÓN

La AR es una poliartritis inflamatoria sistémica que afecta aproximadamente 0,5-1% de la población general y a más mujeres que hombres en una proporción

aproximada de 3:1. Es una enfermedad multifactorial en la cual tanto componentes genéticos como medioambientales contribuyen a la patogénesis de la misma^{1,2} y se considera que la contribución de los genes localizados en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) explica del 30-50% del componente genético.^{3,4} Esta es una enfermedad compleja y autoinmune, en cuyo proceso intervienen múltiples elementos moleculares y celulares del sistema inmune. Además de los genes HLA, los genes de las citoquinas son de particular interés, dada su activa participación en el proceso inflamatorio de la AR.⁵

La principal característica clínica de la AR es la inflamación crónica y simétrica de las articulaciones sinoviales, principalmente de las manos y de las rodillas, con dolor y dificultad para el movimiento, que con el tiempo causan destrucción articular e incapacidad funcional por hipertrofia de la membrana sinovial, pérdida del cartílago y erosión ósea.⁶ En la AR se considera que el proceso inflamatorio es iniciado por las células T CD4+, abundantes en el tejido inflamado.

¹ Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular. Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular. GIEM. Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia.

² Clínica Carlos Ardila Lulle. Floridablanca. Colombia.

³ Departamento de Medicina Interna. Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia.

⁴ Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra. CSIC. Granada. España.

Correspondencia: Gerardo Ramírez. Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular. Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. E-mail: gemensu@yahoo.com.

Recibido: Junio 20 de 2006 / Aceptado: Agosto 29 de 2006

En el sinovium reumatoide predomina la actividad Th1, con presencia de macrófagos activados y de otros leucocitos que liberan citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, entre otros factores que mantienen y magnifican la inflamación, en contraste con una reducida actividad de la respuesta Th2.⁷ La excesiva producción del TNF α está asociada con la patología, su acción proinflamatoria activa y estimula células de la membrana sinovial, células endoteliales, macrófagos y células T y B, por lo que esta citoquina es considerada el eje central del proceso inflamatorio en la AR.⁸ La alta eficacia del tratamiento de los pacientes con anticuerpos anti-TNF α (Infliximab) o con su receptor quimérico recombinante soluble evidencian su responsabilidad en la patología.⁹

Se ha sugerido que la presencia de polimorfismos en los genes de las citoquinas podría estar relacionada con susceptibilidad a la AR y/o con otros aspectos clínicos de la enfermedad.¹⁰ El gen del TNF- α está localizado en la región clase III del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 6. Este gen es altamente polimórfico, se han descrito en la región promotora 5 microsatélites y 15 SNPs algunos de los cuales están involucrados en la regulación de la expresión de la proteína.¹¹ Dos de los polimorfismos más estudiados son el -308, en el cual la presencia de G define el alelo T1 y la de A el alelo T2, estas diferencias alélicas se han asociado con implicaciones funcionales.^{11,12} El polimorfismo -238 se relaciona con el sitio de inicio de la transcripción, en la cual la presencia del alelo G representa el fenotipo silvestre.¹³ Dado que TNF α tiene gran relevancia en la inflamación reumatoide, pequeñas variaciones en su nivel podrían influenciar su efecto, por lo que en este trabajo se evaluó la relación de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del gen TNFA -308 y -238 con susceptibilidad a la AR y con otras condiciones clínicas relacionadas con la severidad, como la edad de inicio, presencia de factor reumatoideo y necesidad de cirugía de reemplazo articular en población Santandereana afectada por AR.

METODOLOGÍA

Pacientes y controles: la muestra estuvo conformada por 102 individuos con Artritis Reumatoidea (casos) que cumplían los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR)¹⁴ y 102 individuos sanos (controles) procedentes del mismo entorno de los pacientes, de sexo y edad similares, sin enfermedad reumática aparente, ni historia familiar de AR. Los pacientes fueron seleccionados de la consulta externa

de Reumatología e Inmunología en la ciudad de Bucaramanga, Colombia. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Industrial de Santander y los individuos de los dos grupos aceptaron su participación mediante la firma del consentimiento informado. Se incluyeron solo individuos adultos mayores de 16 años, que no hubieran recibido transfusiones sanguíneas en los 6 meses previos al muestreo y del grupo de controles se excluyeron familiares entre sí y familiares de los casos.

Datos clínicos de los pacientes: los datos clínicos incluyeron edad, edad de inicio de la enfermedad, criterios de la ACR, rayos X, historia de cirugía articular, índice de incapacidad (HAQ), número de articulaciones dolorosas e inflamadas, entre otros.

Extracción del ADN: el ADN se obtuvo a partir de una muestra de sangre venosa anticoagulada con EDTA, por el método de precipitación con sales o Salting-out¹⁵ y el suero para la determinación de factor reumatoideo se obtuvo de sangre sin anticoagulante.

PCR: el SNP TNF -308 G/A, se determinó por el método de PCR-polimorfismo en la longitud en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)¹⁶ y el SNP -238 A/G por el método de PCR-iniciador específico de secuencia (PCR-SSP).¹⁷ Como control de amplificación de la PCR-SSP se usaron iniciadores para amplificar un fragmento no polimórfico del gen de HLA DR β 1.¹⁸

Factor reumatoideo: fue determinado por el método de aglutinación en látex (HUMANTEX RF, Germany), en el que la presencia de aglutinación en suero no diluido indica un título de 20UI/ml de FR (según indicaciones del fabricante). Un título \geq 20UI se consideró positivo. Esta prueba fue realizada a los dos grupos de estudio en condiciones similares.

Análisis estadístico: se hizo un diseño de casos y controles pareados por edad y sexo. Se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos por conteo directo de los alelos y se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para las frecuencias alélicas poblacionales, mediante el programa Arlequín¹⁹ y coeficiente de fijación de Wright Fst para determinar grado de estructuración de la población que pudieran afectar los resultados (0-0,05 poca estructura, 0,05-0,15 moderada estructura, 0,15-0,25 mucha estructura y 0,25-1 gran estructura).²⁰ En el grupo de afectados se establecieron subgrupos de análisis para asociación de los polimorfismos con diferentes parámetros de la enfermedad, edad de inicio: inicio temprano <45 años e

inicio tardío ≥ 45 años; FR: seronegativos y seropositivos; seropositivos: títulos bajos entre 20 y 192UI y títulos altos ≥ 192 UI; historia de cirugía de reemplazo articular: con historia cirugía y sin cirugía articular. El FR y la historia de cirugía articular fueron considerados como marcadores indirectos de severidad.

Las comparaciones de frecuencias de polimorfismos entre los diferentes grupos de estudio fueron establecidas mediante la construcción de tablas de contingencia de 2×3 y cálculo de χ^2 (ji-cuadrada), con un intervalo de confianza del 95% y $p < 0,05$, programa estadístico Epi-info 6.0. Los análisis de asociación fueron realizados mediante χ^2 de Mantel-Hanzel en tablas 2×2 y la prueba exacta de Fisher para frecuencias menores de 5.²¹ Las razones de posibilidades (OR) y los intervalos de confianza fueron del 95% y $p < 0,05$.

RESULTADOS

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en los dos grupos y subgrupos son mostradas en la tabla 1. Las frecuencias alélicas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). El coeficiente de variación F_{st} reveló baja estructuración de la población ($F_{st}=0,06047$).

Asociación de polimorfismos con desarrollo y/o severidad de la AR: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas o alélicas de los polimorfismos analizados cuando se compararon los pacientes con AR y el grupo control (tabla 1).

Edad de inicio: la edad promedio de inicio de la AR en el grupo estudiado fue de $39,2 \pm 13,85$ años (tabla 2). Se observó una tendencia con protección del genotipo -238 GA, dado que se presentó con mayor frecuencia (21,2%) en el grupo de inicio tardío de la AR (≥ 45 años) comparado con el de inicio temprano (7,2%) ($p=0,046$; OR=0,29; IC=0,07-1,14).

Presencia de FR: los polimorfismos analizados no mostraron ninguna asociación con seropositividad en pacientes con AR ni con los títulos de FR (≥ 20 y < 192 vs ≥ 192 UI/ml); las frecuencias genotípicas y alélicas fueron muy similares entre los grupos, excepto para el genotipo TNF α -308 GA en el grupo con niveles altos de FR, el cual mostró una mayor frecuencia que no alcanzó a ser significativa estadísticamente ($p=0,06$) (tabla 2).

Historia de cirugía de reemplazo articular: No hubo diferencias significativas entre los dos grupos y las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs fueron

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en el promotor de *TNFA* en pacientes con AR y controles.

Frecuencia	Controles (n = 102) (%)	Pacientes con AR (n = 102) (%)
TNFA -308 Alelos		
G	193 (94.6)	188 (92.2)
A	11 (5.4)	16 (7.8)
TNFA -308 Genotipos		
GG	91 (89.2)	87 (85.3)
GA	11 (10.8)	14 (13.7)
AA	0	1 (1.0)
TNFA -238 Alelos		
G	194 (95.1)	190 (93.1)
A	10 (4.9)	14 (6.9)
TNFA -238 Genotipos		
GG	92 (90.2)	89 (87.3)
GA	10 (9.8)	12 (11.7)
AA	0	1 (1.0)

similares (tabla 2). El genotipo TNFA -238 GA y el alelo A se presentaron con mayor frecuencia en el grupo de pacientes sin cirugía (14,5% y 8,6% respectivamente) comparado con el que requirió cirugía (3,8% y 1,9% respectivamente) pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Las tablas 3 y 4 muestran los resultados comparativos de las frecuencias alélicas en la población control evaluada en este trabajo y las realizadas en diversas poblaciones.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han obtenido grandes avances en el estudio de la patogénesis de la AR y los esfuerzos se han concentrado en las citoquinas proinflamatorias especialmente el TNF- α . Esta proteína participa en numerosos eventos relacionados con el proceso inflamatorio sistémico y del sinovio. Los polimorfismos que afectan la región promotora del gen del TNF- α se han asociado con la prevalencia de la AR y su severidad. Dos de los polimorfismos más estudiados son el -308 y el -238 los cuales en algunos reportes se han encontrado asociados a regulación de la expresión de la proteína.¹¹ Este estudio analizó estos dos polimorfismos y su asociación con la susceptibilidad y la severidad de la AR.

Los datos obtenidos muestran que en nuestra población estos SNPs están más relacionados con la severidad que con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. El

Tabla 2. Distribución genotípica de *TNFA* -308 y -238 por características clínicas en los pacientes de AR.

Frecuencia	Edad inicio temprano* (%)	Edad inicio tardía** (%)	FR (-) (%)	FR (+) (%)	FR (+) Títulos bajos† (%)	FR (+) Títulos altos‡ (%)	Cirugía articular (%)	Sin cirugía (%)
TNFA -308								
Alelos								
G	91.3	93.9	91.7	92.4	95.0	90.3	88.5	93.4
A	8.7	6.1	8.3	7.6	5.0	9.7	11.5	6.6
TNFA -308 Genotipos								
GG	82.6	90.9	83.3	86.4	93.3	80.6	80.8	86.8
GA	17.4	6.0	16.7	12.1	3.3	19.4	15.4	13.2
AA	0	3.0	0	1.5	3.3	0	3.8	0
TNFA -238								
Alelos								
G	94.9	89.4	93.1	93.2	93.3	93.1	98.1	91.4
A	5.1	10.6	6.9	6.8	6.7	6.9	1.9	8.6
TNFA -238 Genotipos								
GG	91.3	78.8	86.1	86.4	86.7	88.9	96.2	84.2
GA	7.2	21.2°	13.9	12.1	13.3	8.3	3.8	14.5
AA	1.5	0	0	1.5	0	2.8	0	1.3

* = <45 años. ** = >45 años. † = Entre 20 y 192 IU/ml. ‡ = >192 IU/ml. ° p = 0,046, OR = 0,29 (IC = 0,07-1,14)

genotipo GA del polimorfismo -238 muestra una tendencia de asociación con inicio tardío de la enfermedad ($p = 0,046$) ya que se encontró en un 7,2% de los individuos en los cuales el inicio de la patología fue antes de los 45 años, comparado con 21,2% de aquellos en que el inicio fue posterior a esta edad y se encontró con mayor frecuencia, aunque no estadísticamente significativa, en los pacientes sin cirugía de reemplazo (3,8% con cirugía vs 14,5% sin cirugía). Estos resultados se correlacionan con los reportados en otras poblaciones como la alemana, donde los heterocigotos (GA) para -238 presentan menor severidad de las erosiones²² y en población italiana donde los genotipos GA y el alelo A se encuentran disminuidos en los pacientes con artritis reumatoidea severa,²³ mientras en población mexicana el genotipo GG está asociado con la no severidad de la patología.²⁴

El polimorfismo -308 no mostró asociación ni genotípica, ni alélica con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, resultados similares a dos estudios realizados en población española^{25,26} y japonesa²⁷ pero diferentes a los reportados por un estudio realizado en Australia donde se encontró un aumento del alelo A en los pacientes con AR,²⁸ en población colombiana (antioqueña)²⁹ y mexicana.²⁴ Por el contrario, dos estudios de Taiwán y Suecia encontraron un aumento de la incidencia del alelo G en los pacientes con AR comparados con los controles.^{16,30} Este polimorfismo también ha sido asociado con severidad,^{25,31-33} en nuestro estudio solamente encontramos tendencia de asociación del alelo -308A con niveles elevados de FR ($p = 0,06$).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *TNFA* -308 en diferentes poblaciones del mundo.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TNFA -238 en diferentes poblaciones del mundo.

	Colombia	Antioquia	México	EU	España	Italia	Alemania	Hungría
	(n=102)	(n=419)	(n=169)	(n=80)	(n=102)	(n=140)	(n=116)	(n=39)
Genotipos								
GG	90,2	77,4	91,3	80,0	81,4	86,0	90,5	96,8
GA	9,8	2,3	7,3	17,5	18,6	14,0	9,5	3,2
AA	0	2,3	1,3	2,5	0	0	0	0
Alelos								
G	95,1	93,1	93,1	88,8	90,7	93,5	95,8	98,4
A	4,9	4,9	4,9	11,2	9,3	6,5	4,2	1,6

Estos resultados contradictorios pueden ser debidos a algunos factores relacionados con el análisis de un número pequeño de pacientes, constitución genética de las poblaciones que pueden estar enmascaradas por interacciones de los genes con el medio ambiente, la selección de un grupo control no adecuado por estratificación de la población y la presencia de desequilibrio de ligamiento (LD), entre otros.

En el caso de la constitución genética de las poblaciones se ha observado que las frecuencias genotípicas y alélicas varían. En los estudios realizados en poblaciones colombianas, aunque las diferencias no fueron muy marcadas, el alelo A de TNFA -308 en los grupos controlados, fueron similares en población caucana y 2,7 veces más frecuentes en la población antioqueña comparado con la población santandereana.^{34,29} Esta discrepancia podría ser debida a diferencias raciales, heterogeneidad en el muestreo o el número de individuos analizados. La población colombiana es racialmente heterogénea debido a la mezcla de al menos tres grupos raciales: el caucásico, el negroide y el indígena, además de las diferencias interregionales que han marcado rasgos particulares, generados por el origen de los grupos colonizadores, las poblaciones indígenas locales y el aislamiento sociocultural que aún hoy persiste desde la colonización.³⁵ Estudios más amplios son necesarios para definir rasgos genéticos regionales que podrían ser de utilidad en la investigación de la susceptibilidad a la enfermedad. En relación con otras poblaciones se observa mayor presencia del genotipo heterocigoto y del alelo A en la población antioqueña y alemana^{22,29,36} comparada con los estudios de Santander, Cauca, Chile, España, Italia y Japón.^{25,34,37-39} Estas diferencias también son observadas en el polimorfismo -238 en donde el alelo A está presente en más del 10% en poblaciones como la antioqueña y la de Estados Unidos (EU) y las frecuencias de heterocigotos son mayores al 15% en poblaciones antioqueña, de EU y de España.^{25,29,40}

Otros estudios han encontrado asociaciones positivas con polimorfismos presentes en otras regiones del gen TNFA que podrían estar asociadas con regulación en la expresión de la proteína⁴¹ y otros analizan haplotipos extendidos en relación con genes del MHC.⁴² Por lo tanto, son necesarios más estudios para evaluar la contribución directa de los polimorfismos -238 y -308 en la patogénesis de la enfermedad y realizar estudios de mapeo fino para establecer los desequilibrios de ligamiento con otros loci que puedan estar implicados en el desarrollo de la AR.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por COLCIENCIAS (código 1102-04-12905) y la Universidad Industrial de Santander. Agradecemos a la Bacterióloga Carmen Cecilia Cabrales por su excelente asistencia técnica y manejo administrativo.

REFERENCIAS

1. Silman AJ, Pearson JE. "Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res* 2002; 4: S265-72
2. Nepom GT. "The role of the DR4 shared epitope in selection and commitment of autoreactive T cells in rheumatoid arthritis." *Rheumatic Disease Clinics of North America* 2001; 27: 305-16
3. Newton JL, Harney SMJ, Wordsworth BP, Brown MA. "A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis." *Genes Immun* 2004; 5: 151-7
4. Deighton CM, Walter DJ, Griffiths ID, Robertos DF. "The contribution of HLA to rheumatoid arthritis." *Clin Genet* 1989; 36:178-82
5. Firestein GS. "Evolving concepts of rheumatoid arthritis". *Nature* 2003; 423: 356-61
6. Williams EA, Fye KH. "Rheumatoid arthritis: Targeted interventions can minimize joint destruction." *Postgraduate Med* 2003; 114: 19-82

7. Arend WP, Gabay C. "Cytokines in the rheumatic diseases". *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30: 41-67
8. Choy EH, Panayi GS. "Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis." *N Engl J Med* 2000; 344: 907-16
9. Suryaprasad AG, Prindiville T. "The biology of TNF Blockade." *Autoimmun Rev* 2003; 2: 346-57
10. Barton A, Plantt H, Salway F, Symmons D, Barrett E, Bukhari M, et al. "Polymorphisms in the tumour necrosis factor gene are not associated with severity of inflammatory polyarthritis." *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 280-4
11. Bayley JP, Ottenhoff T, Verweij CL. "Is there a future for TNF promoter polymorphisms?" *Genes Immun* 2004; 5: 315-29
12. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevit HA, Duff GW. "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation." *PNAS* 1997; 94: 3195-9
13. D'Alfonso S, Richardi PM. "A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF alpha promoter region." *Immunogenet* 1994; 38: 150-4
14. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Pries JF, Cooper NS et al. "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria por classification of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24
15. Miller SA, Dykes DD, Plesky HF. "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucl Acids Res* 1988; 16: 215
16. Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, Wu CC, Liu HW. "Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan." *J Rheumatol* 2001; 28: 1788-92
17. Ackerman HC, Ribas G, Jallow M, Mott R, Neville M, Sisay-Joof F, et al. "Complex haplotypic structure of the central MHC region flanking TNF in a West African population." *Genes Immunity* 2003; 4: 476-86
18. Mullighan CG, Marshall SE, Bunce M, Welsh KI. "Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of common variable immunodeficiency." *Genes Immun* 1999; 1: 137-8
19. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. "Arlequin ver. 2000. A software for population genetics data analysis." Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
20. Hartl DL, Clark AG. Principles of population genetics. 2da edición. Sunderland-Massachetts. Sinauer Associate inc publishers, 1989: 293-8
21. Daniel WW. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª edición. México, D.F. Edit. Limusa Wiley, 2002: 571-657
22. Brinkman BMN, Huizinga TWJ, Kurban SS, Van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, et al. "Tumour necrosis factor a gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease?" *Br J of Rheumatol* 1997; 36: 516-21
23. Fabris M, Di PE, D'Elia A, et al. "Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 2002; 29: 29-33
24. Rodríguez-Carreón AA, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Montes de Oca JV, Cardiel MH, Granados J, Vargas-Alarcón G. "Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans." *J Autoimmun* 2005; 24: 6368
25. Vinasco J, Berún Y, Nieto A, Fraile A, Matarán L, Pareja E, Martín J. "Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis." *Tissue Antigen* 1997; 49:74-8
26. Martínez A, Fernández-Arquero M, Pascual-Salcedo D, et al. "Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1366-70
27. Shibue T, Tsuchiya N, Komata T, et al. "Tumor necrosis factor alpha 5' flanking region, tumor necrosis factor receptor II, and HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 2000; 43: 753-7
28. Danis VA, Millington M, Hyland V, et al. "Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor-alpha gene in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." *Dis markers* 1995; 12: 127-33
29. Correa PA, Gómez LM, Cadena J, Anaya JM. "Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with *TNF* polymorphism." *J Rheumatol* 2005; 32: 219-24
30. Torres MM, Acosta CP, Sicard DM, de Restrepo HG. "Susceptibilidad genética y riesgo de cáncer gástrico en una población del Cauca". *Biomédica* 2004; 24: 153-62
31. Cvetkovic JF, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapää-Dahlqvist S, Lefvert AK. "Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-a, IL-1b and IL-1Ra genes." *J Rheumatol* 2002; 29: 212-9
32. Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P, Hutchinson IV, Ollier WE. "IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis." *Scand J Rheumatol* 1998; 27: 142-5
33. Huizinga TW, Keijsers V, Yanni G, Hall M, Ramage W, Lanchbury J, et al. "Are differences in interleukin 10 production associated with joint

- damage.” *Rheumatol* 2000; 39: 1180-8
34. Padyukov L, Lampa J, Heimbürger M, Ernestam S, Cederholm T, Lundkvist I, et al. “Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis.” *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 526-9
 35. Yunis E. ¿Por qué somos así? ¿Qué pasó en Colombia? Análisis del mestizaje. Bogotá, Colombia. Edit. Temis S.A. 2004: 22-121
 36. Reich K, Westphal G, König IR, Móssner R, Schupp P, Gutgesell C, et al. “Cytokine gene polymorphisms in atopic dermatitis”. *Br J Rheumatol* 2003; 148: 1237-41
 37. Cuenca J, Cuchacovich M, Pérez C, Ferreira L, Aguirre A, Schiattino I, et al. “The -308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and *ex vivo* lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis.” *Rheumatol* 2003; 42: 308-13
 38. Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtioni ES. “Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population.” *Eur J Immunogenet* 2003; 30: 5-10
 39. Quasney MW, Bronstein DE, Cantor RM, Zhang Q, Stroupe C, Shike H. et al. “Increased frequency of alleles associated with elevated tumor necrosis factor- α levels in children with Kawasaki disease.” *Pediatric Res* 2001; 49: 686-90
 40. Vatay A, Yang Y, Chung EK, Zhou B, Blanchong CA, Kovacs M, et al. “Relationship between complement components C4A and C4B diversities and two TNFA promoter polymorphisms in Two Healthy Caucasian Populations.” *Hum Immunol* 2003; 64: 543-52
 41. Udalova IA, Richardson A, Ackerman H. “Association of accelerated erosive rheumatoid arthritis with a polymorphism that alters NF-kappa B binding to the TNF promoter region.” *Rheumatology* 2002; 41: 830-1
 42. Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, et al. “Identification of I Kappa BL as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis.” *Am J Hum Genet* 2003; 72: 303-12