

Efecto del polimorfismo del promotor de TNF α en la producción de TNF α y en la respuesta de fase aguda en pacientes con enfermedad de Crohn*

J Martínez-Borra¹, S González³, C López-Larrea¹, L Rodrigo², EM Deschamps¹, MA Diéguez¹

Resumen

Introducción. El factor de Necrosis Tumoral (TNF α) tiene un papel clave en la respuesta inflamatoria y en la patogénesis de la enfermedad de Crohn.

Objetivo. Investigar el efecto del polimorfismo del promotor del TNF α en posición -308 en la susceptibilidad y en la expresión fenotípica de la enfermedad de Crohn.

Pacientes y métodos. Se analizó la distribución de los genotipos -308 del TNF α en 27 pacientes con enfermedad de Crohn fistulizante. Se determinó la concentración del TNF α y las proteínas de fase aguda en los pacientes y en los 28 controles sanos. El TNF α se midió mediante enzoinmunoanálisis (ELISA). Las proteínas de fase aguda se midieron por nefelometría.

Resultados. Se observaron concentraciones mayores de TNF α (26 vs 3,1 pg/mL, $p < 0,05$) y de las proteínas de fase aguda en pacientes con respecto a los controles: PCR: proteína C reactiva (17 vs < 3 mg/L, $p < 0,001$), SSA: proteína sérica amiloide A (91 vs 2,46 mg/L, $p < 0,001$), AAT: $\alpha 1$ -antitripsina (206 vs 126 mg/dL, $p < 0,001$), AAG: $\alpha 1$ -glicoproteína ácida (140 vs 76 mg/dL, $p < 0,001$) y HPT: Haptoglobina (220 vs 112 mg/dL, $p < 0,001$). No se encontraron diferencias en la frecuencia del polimorfismo -308 entre los pacientes y los controles. Sin embargo, los pacientes que llevan -308AG tienen mayores concentraciones de TNF α (82,2 vs 13,7 pg/mL, $p < 0,03$) y de las proteínas de fase aguda (PCR: 32,4 vs 13,5 pg/mL, $p = 0,034$ y AAG: 195 vs 129,7 mg/dL, $p = 0,014$) que los que llevan -308GG.

Conclusiones. El polimorfismo -308A está asociado a una mayor producción de TNF α y de las proteínas de fase aguda en pacientes con enfermedad de Crohn.

Palabras clave: Enfermedad de Crohn, TNF α , polimorfismo, proteínas de fase aguda.

Introducción

La enfermedad de Crohn (EC) es un proceso inflamatorio crónico y recurrente, de etiología desconocida, que se caracteriza por una inflamación transmural y segmentaria que

Summary

Introduction. Tumour Necrosis Factor α (TNF α) plays a key role in the inflammatory response and pathogenesis of Crohn's disease.

Aim. To investigate the effect of TNF α promoter polymorphism at -308 on the susceptibility and phenotypic expression of Crohn's disease.

Patients and methods. The distribution of -308 TNF α genotypes was analysed in 27 patients with fistulizing Crohn's disease. Circulating concentrations of TNF α and acute phase proteins were determined in patients and 28 healthy controls. TNF α was measured by ELISA. Acute phase proteins were measured by nephelometry.

Results. Higher levels of TNF α (26 vs $3.1 \pm$ pg/mL, $p < 0.05$) and acute phase proteins was observed in patients compared with controls: PCR (17 vs < 3 mg/L, $p < 0.001$), SSA (91 vs 2.46 mg/L, $p < 0.001$), AAT (206 vs 126 mg/dL, $p < 0.001$), AAG (140 vs 76 mg/dL, $p < 0.001$) and HPT (220 vs 112 mg/dL, $p < 0.001$). No significant differences were found in the allele frequencies of the polymorphism between patients and controls. However, compared with -308GG patients, those carrying -308AG had a significant increase of serum levels of TNF α (82.2 vs 13.7 pg/mL, $p < 0.03$) and acute phase proteins: PCR (32.4 vs 13.5 pg/mL, $p = 0.034$) and AAG (195 vs 129.7 mg/dL, $p = 0.014$).

Conclusions. TNF α -308A polymorphism is associated with enhanced TNF α and acute phase protein production in Crohn's disease patients.

Key words: Crohn's disease, TNF α , polymorphism, acute phase proteins.

afecta a cualquier parte del tracto digestivo. En una tercera parte de los pacientes la enfermedad se complica con el desarrollo de fístulas internas o externas (1). Los cambios funcionales que se producen en la mucosa intestinal de los pacientes con EC son debidos, en parte, al incremento de la secreción

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Cáceres el 3, 4 y 5 de octubre de 2001

¹Servicio de Inmunología y ²Digestivo del Hospital Central de Asturias. Oviedo.

³Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo.

Recibido: 12-3-01

Aceptado: 26-7-02

Abreviaturas no estandarizadas:

PCR: Proteína C reactiva

SSA: Proteína sérica amiloide A

AAT: $\alpha 1$ -antitripsina

AAG: $\alpha 1$ -glicoproteína ácida

HPT: Haptoglobina

EC: Enfermedad de Crohn

CEDAI: Índice de actividad de la Enfermedad de Crohn

de citocinas proinflamatorias que se producen en la lámina propia. Numerosos estudios han mostrado que los fagocitos intestinales de los pacientes con EC secretan elevadas cantidades del factor de necrosis tumoral α (TNF α) (2,3), lo cual tiene una gran importancia en la iniciación y propagación de la enfermedad (4-6). De acuerdo con esto, la terapia con anticuerpos anti-TNF α ha demostrado tener un gran efecto en la disminución de la actividad inflamatoria de la enfermedad (7,8).

El TNF α es una citocina pleotrópica que es producida principalmente por los monocitos y los macrófagos activados. Entre los efectos del TNF α se encuentra el incremento de la producción de las proteínas de fase aguda por el hígado (9,10). Por tanto, la determinación de la concentración sérica de las proteínas de fase aguda es un sistema útil de establecer la actividad inflamatoria de la EC, de monitorizar la respuesta al tratamiento y de predecir la remisión de la enfermedad.

Hay evidencias de que la expresión del TNF α está determinada, en parte, genéticamente. Así, aunque se ha descrito que se producen variaciones diarias en la capacidad de producir TNF α , aproximadamente un 60% de la variación de su producción parece estar determinado genéticamente (11). Estudiando el promotor de este gen se han encontrado polimorfismos en determinados lugares de su secuencia (12) (figura 1). Algunos de estos polimorfismos están asociados con una mayor producción de TNF α . *In vitro*, se ha descrito que la presencia de una adenina en posición -308 del promotor está asociada con un incremento de 6-7 veces en la transcripción (13). Se han descrito numerosas asociaciones de éste y otros polimorfismos con enfermedades inflamatorias, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal (14-19), aunque estas asociaciones no han sido confirmadas por otros trabajos (20-22). Estos resultados contradictorios pueden deberse a las variaciones genéticas entre las diferentes poblaciones o a las variaciones en el fenotipo de los pacientes estudiados. Sin embargo, el perfil genético puede afectar no sólo a la susceptibilidad a la enfermedad sino también modificar el fenotipo de la misma. Así, el polimorfismo -308,2 (A en la posición -308) que se ha asociado con una mayor producción de TNF α podría estar asociado no sólo con la EC en su conjunto sino que podría estar diferentemente asociado con los distintos subgrupos de pacientes (17). Estos datos sugieren que, considerando grupos homogéneos de pacientes, podría darse una asociación con estos polimorfismos.

El objetivo de este trabajo es estudiar el polimorfismo en la posición -308 del promotor del TNF α en los pacientes con EC fistulizante y determinar como afectan a la producción del TNF α y de las proteínas de fase aguda.

Material y métodos

Pacientes

Para este estudio se seleccionaron por el Servicio de Digestivo del Hospital Central de Asturias 27 pacientes con EC (15 hombres y 12 mujeres; edad 36 \pm 9 años, rango 17-72 años) con fístulas abdominales 1 (4%) o perianales 26 (96%). El diagnóstico y extensión de la enfermedad se hizo sobre la base de los síntomas clínicos, estudios endoscópicos, radiológicos e histopatológicos, siguiendo criterios convencionales (23). El grado de actividad de la enfermedad se determinó mediante el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CEDAI) (24).

Determinación del polimorfismo del promotor del TNF α
Se extrajo el DNA a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el método de extracción con sales (25). Para determinar el polimorfismo del promotor del gen del TNF α se utilizó la técnica PCR-ACRS (*amplification-created restriction sites*) basada en la técnica de Vinasco *et al* (26) con modificaciones. Se utilizaron los oligonucleótidos sentido: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGTCCAT-3' antisentido: 5'-GAAAGTTGGGACACAC AAGCAT-3', que dan un producto de 154 pares de bases (pb), que se digiere con la enzima de restricción *NcoI*, que corta cuando hay una G en posición -308, dando dos bandas, una de 132 pb y otra de 22 pb.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 96°C durante 3 min y 35 ciclos consistentes en 95°C 1 min, 57°C 1 min y 75°C 90 seg. Para visualizar las bandas se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 4% en tampón Tris-acetato (TAE) preteñido con bromuro de etidio.

Determinación de las concentraciones de TNF α y de las proteínas de fase aguda

El TNF α fue medido con un ELISA comercial tipo «sandwich» (Diacclone Research, Besaçon, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, un anticuerpo monoclonal específico para TNF α está unido a los pocillos. Durante la primera incubación se añadió simultáneamente el TNF α y un anticuerpo monoclonal específico para TNF α . Después de lavar se añadió la enzima (estreptavidina-peroxidasa). Después de incubar y lavar para eliminar toda la enzima que quedara sin unir, se añadió un sustrato sobre el que actúa la enzima, produciéndose una sustancia coloreada. La sensibilidad del análisis fue de 6 pg/mL.

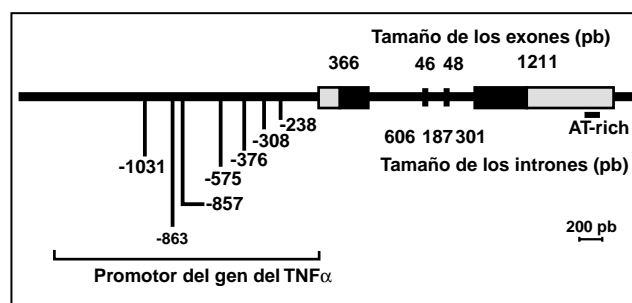


Figura 1. Organización del gen del TNF α y posición de los polimorfismos descritos en su promotor.

Determinación de las proteínas de fase aguda

Las proteínas de fase aguda se determinaron mediante nefelometría. La proteína sérica amiloide A (SSA) y la proteína C reactiva (PCR) se midieron por nefelometría mediante el método del punto final utilizando el Nephelometer Analyzer II[®] de Behring (Dade-Behring, Marburg, Alemania); la α 1-antitripsina (AAT), la α 1-glicoproteína ácida (AAG) y la haptoglobina (HPT) se midieron mediante un analizador IMMAGE[®] (Beckman Instruments, Brea, USA) por nefelometría continua.

Análisis estadístico

Los datos se han expresado como media y desviación típica. La distribución Gausiana de los valores se determinó mediante

la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los valores que seguían una distribución Gaussiana se compararon con un prueba t de Student. La significación entre datos que no están normalmente distribuidos se determinó mediante la prueba U de Mann-Whitney. La asociación entre variables se determinó mediante el coeficiente de correlación de rangos de Spearman. La diferencia entre las frecuencias de los polimorfismos del promotor en la poblaciones se estableció utilizando la prueba chi-cuadrado (χ^2) con la corrección de Yates. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (versión 8.0).

Resultados

Concentraciones de TNF α y proteínas de fase aguda

En el presente estudio se analizaron 27 pacientes con EC y 28 controles sanos. Los valores séricos se detectaron en 11 pacientes (40%) y en 3 controles (<20%). Los pacientes presentaron concentraciones séricas de TNF α significativamente mayores que los controles 26 ± 53 vs $<3,1$ pg/mL, $p < 0,05$). En la mayoría de los controles sanos no se detectó TNF α en sangre periférica al nivel de detección del análisis (~ 6 pg/mL). De forma similar, se analizaron las concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda. Los pacientes presentaron las concentraciones de las proteínas de fase aguda significativamente incrementadas: PCR (17 ± 18 vs <3 mg/L, $p < 0,001$), SSA (91 ± 148 vs $2,46 \pm 2,23$ mg/L, $p < 0,001$), AAT (206 ± 57 vs 126 ± 31 mg/dL, $p < 0,001$), AAG (140 ± 55 vs 76 ± 18 mg/dL, $p < 0,001$) y HPT (220 ± 99 vs 112 ± 39 mg/dL, $p < 0,001$).

Debido a que el TNF α es el principal regulador de la respuesta de fase aguda hepática, se determinó la correlación entre estas citocinas y la respuesta de fase aguda en los pacientes. Las proteínas de fase aguda estaban, en general, fuertemente correlacionadas unas con otras. La PCR estaba correlacionada significativamente con la SSA ($\rho = 0,67$, $p < 0,001$), AAT ($\rho = 0,53$, $p = 0,004$), AAG ($\rho = 0,86$, $p < 0,001$) y HPT ($\rho = 0,65$, $p < 0,001$). La AAG estaba significativamente correlacionada con la SSA ($\rho = 0,61$, $p = 0,001$), AAT ($\rho = 0,43$, $p = 0,024$) y HPT ($\rho = 0,8$, $p < 0,001$). La SSA estaba también correlacionada con la HPT ($\rho = 0,5$, $p < 0,001$). No se encontró correlación entre ningún parámetro de laboratorio y la actividad clínica de la enfermedad (CEDAI).

Análisis de la distribución de los polimorfismos del promotor del TNF α y su efecto sobre la producción de TNF α y de las proteínas de fase aguda

Se obtuvo DNA de los 27 pacientes con EC fistulizante. El polimorfismo en posición -308 del promotor del TNF α se analizó mediante PCR-ARMS (*amplification refractory mutation system*) en enfermos y se comparó con la frecuencia en una población control ($n = 100$) que había sido analizada previamente (27). No se encontraron diferencias significativas del polimorfismo entre enfermos y controles. El TNF-308A se encontró en el 18% ($n = 5$) de los pacientes y en el 20% ($n = 20$) de los controles. Estos datos sugieren que el polimorfismo del TNF α no afecta a la susceptibilidad global a la enfermedad.

Para determinar si el polimorfismo del promotor tiene algún efecto en la producción de TNF α , se compararon las concentraciones séricas de TNF α en pacientes portadores de los diferentes polimorfismos. Los que llevaban el polimorfismo -308A tenían aproximadamente 6 veces más TNF α en el suero que los que llevaban -308G ($82,2 \pm 101$ vs $13,7 \pm 25$ pg/mL,

$p < 0,03$). En concordancia con esto, también se encontró un incremento de las proteínas de fase aguda.

Los incrementos de la SSA (282 ± 275 vs 47 ± 47 mg/L $p = 0,119$), AAT ($245 \pm$ vs $197 \pm$ mg/dL $p = 0,091$) y HPT (227 ± 142 vs 207 ± 87 mg/dL $p = 0,064$), no eran estadísticamente significativos. Sin embargo, la PCR ($32,4 \pm 20$ vs $13,5 \pm 16$ pg/mL, $p = 0,034$) y la AAG (195 ± 53 vs $129,7 \pm 49$ mg/dL, $p = 0,014$) estaban significativamente incrementadas.

Discusión

En el promotor del gen del TNF α se han descrito varios polimorfismos (12), sin embargo, es todavía un asunto controvertido si tienen algún efecto en la susceptibilidad a la EC. Todavía no se ha estudiado el efecto directo de estos polimorfismos en el desarrollo o en la actividad inflamatoria en pacientes con EC. El objetivo de nuestro estudio fue analizar el efecto del polimorfismo localizado en la posición -308 en la producción de TNF α y en la actividad inflamatoria de los pacientes con EC.

Una cuestión interesante es si el perfil genético, afecta a la susceptibilidad a la enfermedad o a sus manifestaciones fenotípicas. Si los polimorfismos del promotor del TNF α afectaran a su expresión, sería de esperar una diferente asociación entre los diferentes subgrupos de enfermos. Por ejemplo, la frecuencia de TNF2 (-308A) no estaba asociada significativamente en pacientes con EC en su conjunto, pero era significativamente mayor en un subgrupo de pacientes con EC dependiente de esteroides (17). Todos estos datos en su conjunto enfatizan la idea de que el polimorfismo en la región promotora del TNF α pueden afectar al curso de la enfermedad y por tanto debe ser analizada cuidadosamente en subgrupos clínicos homogéneos.

Para analizar los efectos de estos polimorfismos en la producción de TNF α , hemos medido las concentraciones séricas de esta citocina en un grupo de pacientes con EC fistulizante. El TNF α sérico probablemente proviene del producido por los macrófagos del intestino y aunque sea una estimación de las concentraciones intestinales, la medida del TNF α sérico es un medio no invasivo muy útil para la monitorización clínica de los pacientes con EC, lo que podría permitir comparar los niveles de expresión de TNF α entre ellos. En nuestro estudio detectamos que los pacientes que eran portadores de una copia del polimorfismo -308A producen un incremento de 6 veces de la producción de TNF α . Estudios *in vitro* han mostrado que este polimorfismo afecta a un sitio de unión de un factor de transcripción y por tanto a los niveles de transcripción del gen (13). Nuestro resultado está también de acuerdo con los efectos que se han descrito de este polimorfismo en pacientes con EC. Así, el polimorfismo 308A incrementa la producción de TNF α en biopsias de colon (17) y en ex vivo en sangre total estipulada por Lipopolisacáridos (18).

El incremento de la producción de TNF α puede tener un efecto directo en la actividad inflamatoria de la mucosa intestinal. La presencia del TNF2 puede reflejar una reacción inflamatoria más agresiva. Así, se ha descrito que el polimorfismo -308A puede favorecer la enfermedad esteroide dependiente y en menor medida la enfermedad fistulizante, posiblemente secundaria a una reacción inflamatoria a nivel de la mucosa debida al TNF α (17). Además, el TNF α producido localmente actúa como mediador inicial de la inflamación y en la inducción de la respuesta de fase aguda. El hígado es la principal diana del TNF α y de otras citocinas que se producen en res-

puesta al aumento del TNF α . Estas citocinas actúan como estimuladores primarios de las proteínas de fase aguda. Así, las concentraciones de la PCR y otras proteínas de fase aguda son útiles como marcadores para la monitorización del estado clínico de los pacientes, la actividad inflamatoria de la enfermedad o de la respuesta al tratamiento. En nuestro estudio, en consonancia con el incremento en la expresión del TNF α en pacientes con EC que portan el alelo -308A, hay también un incremento de las proteínas de fase aguda, lo que refleja una actividad inflamatoria más intensa en estos pacientes. Estos datos sugieren que el perfil genético de un individuo y en particular el polimorfismo del promotor del TNF α afecta *in vitro* al fenotipo de la enfermedad y sugiere que el análisis genético puede ser útil para determinar aquellos individuos que pueden desarrollar una enfermedad más agresiva, con una reacción inflamatoria más intensa.

Correspondencia:
M. Ángeles Diéguez
Servicio de Inmunología
Hospital Central de Asturias
c/ Celestino Villamil s/n
33006 Oviedo.

Bibliografía

- Williams DR, Collier JA, Corman ML, Nugent FW, Veindenheimer MC. Anal complications in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1981; 24: 24-4
- Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, Duhaime A, Seidman EG. Quantitative PCR analysis of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA levels in pediatric IBD mucosal Biopsies. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 157-66.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Plueger I, Schreiber S, MacDermont RP, *et al.* Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 174-81
- van Deventer SJH. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997; 40: 443-8.
- Brynskov J, Nielsen OH, Ahnfelt-Ronne I, Bendtzen K. Cytokines (immunoinflammatory hormones) and their natural regulation in inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis): a review. *Dig Dis* 1994; 12: 290-304.
- Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992; 339: 89-91.
- Stack WA, Mann SD, Roy AJ, Heath P, Sopwith M, Reeman J, *et al.* Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor-alpha in Crohn's disease. *Lancet* 1997; 349: 521-4
- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *New Engl J Med* 1997; 337: 1029-35.
- Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology Today* 1994; 15: 74-80.
- Gaby C, Kushner I. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340: 448-54.
- Westendorp RGJ, Llangermans JAM, Huizenga TWJ, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 170-3.
- Allen R. Polymorphism of the human TNF α promoter - random variation or functional diversity? *Mol Immunol* 1999; 36: 1017-27.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-9.
- Louis E, Satsangi J, Roussomoustakaki M, Parkes M, Fanning G, Welsh K *et al.* Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 39: 705-10
- Plevy SE, Targan SR, Yang H, Fernández D, Rotter JJ, Toyoda H. Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease-associated haplotype on chromosome 6. *Gastroenterology* 1996; 110: 1053-60.
- Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, Takahashi S, Takagi S, Satoh J, *et al.* Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterology* 1999; 117: 1062-8.
- Louis E, Peeters M, Franshimon D, Seidel L, Fontaine F, Demolin G, *et al.* Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 64-8
- Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh and Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT, alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel disease and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000; 1: 185-90.
- Kawasaki A, Tsuchiya N, Hagiwara K, Takazoe M, Tokunaga K. Independent contribution of HLA-DRB1 and TNF alpha promoter polymorphisms to the susceptibility to Crohn's disease. *Genes Immun* 2000; 1: 351-7
- Heresbach D, Ababou A, Bourienne A, Alizdeh M, Quelvenec E, Pagenault M, *et al.* Polymorphism of the microsatellites and tumor necrosis factor genes in chronic inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 1997; 21: 555-61.
- Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, von Blomberg BM, *et al.* Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 391-6
- Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, lantermann A, Mascheretti S, *et al.* Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1647-55
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 170: 2-6.
- Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Dern F. Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterology* 1979; 70: 439-44.
- Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215
- Vinasco J, Beraún Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E, *et al.* Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; 49: 74-8.
- González S, Torre-Alonso JC, Martínez-Borra J, Fernández Sánchez JA, López-Vázquez A, Rodríguez Pérez A, *et al.* TNF-238 promoter polymorphism contributes to susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27 negative patients. *J Rheumatol* 2001; 28: 1288-93.