

Asociación entre los polimorfismos -308 y -238 del gen TNF- α y la artritis reumatoide (datos preliminares)

Carlos Mestanza^{1,2}, Camilo Zurita-Salinas^{2,3}, Estefanía Espín², David Ortega-Paredes², Marcelo Mora², Carlos Vallejo⁴, Rómulo Villacís⁵ y Marilú Mestanza-Peralta⁶

¹ Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador

² Unidad de Investigaciones en Biomedicina. Zurita&Zurita Laboratorios. Quito, Ecuador
camiloszuritas@zuritalaboratorios.com

³ Cátedra de inmunología. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador

⁴ Centro de Artritis. Quito, Ecuador

⁵ Hospital Carlos Andrade Marín. Departamento de Reumatología. Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social. Quito, Ecuador

⁶ Fundación para las Enfermedades Reumáticas (FUNDARVI). Quito, Ecuador

Recibido: 30, 06, 2013; aceptado: 04, 10, 2013

RESUMEN.- La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica que afecta del 0.5 hasta el 2 % de la población mundial. En el Ecuador, la prevalencia reportada es del 0.9 %. Recientemente se han estudiado los polimorfismos en varios genes con el fin de encontrar su relación con la enfermedad. Dos de los polimorfismos más estudiados son el -308 y el -238 del gen TNF- α . Nosotros analizamos la presencia de estos polimorfismos en cuarenta individuos previamente diagnosticados con AR y veinticinco individuos sanos mediante la RCP-TR (*endpoint genotyping*). Se empleó ELISA para medir los niveles de marcadores de AR. La actividad de la enfermedad fue medida mediante DAS 28. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la declaración de Helsinki. No se establecieron diferencias significativas entre las frecuencias de ambos polimorfismos entre los individuos sanos y los pacientes con AR. El 69 % de los individuos con el polimorfismo -238GA presentaron una baja actividad de la enfermedad (SB DAS 28), mientras que el 67 % y 57 % de individuos con los polimorfismos -238GG y -238AA respectivamente, presentaron una actividad media (SM DAS 28). Nuestro trabajo es el primero que relaciona AR y polimorfismos genéticos que se realiza en el Ecuador. Nuestros resultados sugieren que hay una asociación de -238GG con una mayor actividad de la enfermedad, que ha sido reportado previamente.

PALABRAS CLAVES: artritis reumatoide, DAS 28, HLA, polimorfismos, TNF- α

ABSTRACT.- Rheumatoid Arthritis (RA) is a systemic inflammatory disease that affects 0.5 to 2 % of the global population. In Ecuador the reported prevalence of the disease is 0.9 %. Recently, an increase number of polymorphisms have been studied in order to find a relationship between the disease and genetic polymorphisms. Two of the most studied polymorphisms are -308 and -238 of the tumor necrosis factor α (TNF- α) gene. Forty individuals with previous diagnosis of RA and twenty five healthy individuals were analyzed for the presence of the polymorphisms -238 and -308 using RT-PCR (endpoint genotyping). Additionally, levels of RA markers were assessed using ELISA. Disease activity was measured according to clinical data using DAS 28. The study was carried out according to Helsinki declaration standards. No differences were found in genotype frequencies between healthy and RA individuals in both polymorphisms. Results showed that most -238GA individuals (69 %) had low disease activity according to DAS28 (SB DAS28); in contrast to -238GG and -238AA polymorphisms in which most individuals (67 % and 57 %) had medium disease level (SM DAS 28). This is the first study on relationship between RA and genetic polymorphisms carried out in Ecuador. Our results suggest the association between -238GG polymorphism and a higher progression of the disease, reported previously.

KEYWORDS: DAS 28, HLA, polymorphisms, rheumatoid arthritis, TNF- α

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica que afecta principalmente a las articulaciones, pero puede afectar órganos y tejidos. Es una condición dolorosa que en casos graves conduce a una importante pérdida de las funciones motrices en el paciente (Majithia *et al.*, 2007). A nivel mundial, la AR afecta del 0.5 hasta el 2 % de la población (Silman y Pearson, 2002; Nepom, 2001) y en el Ecuador, la prevalencia reportada es del 0.9 %. (Mestanza *et al.*, 2006).

La artritis reumatoide presenta una fuerte predisposición genética para el desarrollo y actividad de la enfermedad, calculado entre el 40 y 60 % (MacGregor *et al.*, 2000). Con esta premisa, se han llevado a cabo varios trabajos de mapeo genético, realizados en diversas poblaciones humanas, en las cuales se ha identificado a la región genética de los Antígenos Leucocitarios Humanos, HLA (*Human Leukocyte Antigen*), como la única región en el genoma humano aparentemente ligada a la artritis reumatoide (Tamiya *et al.*, 2005; Osorio *et al.*, 2004; John *et al.*, 2004).

La región HLA, también conocida como complejo mayor de histocompatibilidad, MHC (*Mayor Histocompatibility Complex*), se encuentra compuesta por tres regiones: HLA de clases I, II y III, las cuales comprenden grupos de genes relacionados con la respuesta inmune (Figura 1). El locus HLA de clase II, ha sido reconocido como el principal factor de riesgo genético. Deighton y colaboradores,

1989, concluyen que las moléculas de HLA de clase II contribuyen al efecto genético solo en un 30 %, por lo cual, polimorfismos de genes en otras regiones, como el gen codificante del factor de necrosis tumoral alfa, TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*), han sido estudiados por su posible contribución a la susceptibilidad y el progreso de la artritis reumatoide.

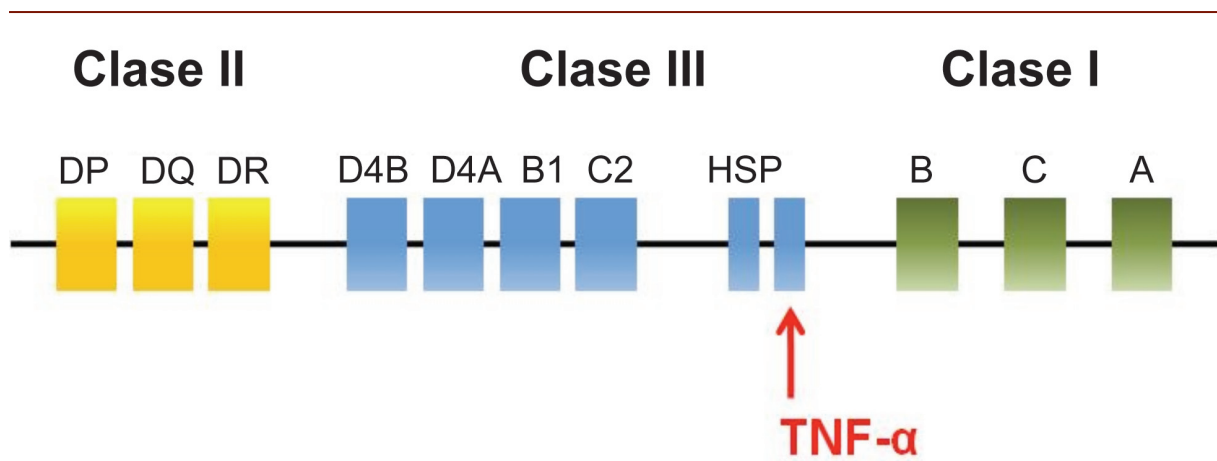


Figura 1.- Esquema de la ubicación del gen TNF- α en la región genética de los Antígenos Leucocitarios Humanos, HLA (*Human Leukocyte Antigen*). El factor de necrosis tumoral, TNF- α , se encuentra dentro de la región HLA del genoma humano en el grupo de genes de HLA de clase III, en el brazo corto del cromosoma 6, posición 6p21.3.

El gen TNF- α se encuentra dentro del grupo de genes de HLA de clase III, en el brazo corto del cromosoma 6, posición 6p21.3. Este gen codifica una citocina multifuncional pro-inflamatoria envuelta en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos, los cuales incluyen: proliferación y diferenciación celulares, así como apoptosis. Esta citoquina ha sido implicada en una variedad de desórdenes autoinmunes, como la artritis reumatoide.

En muchos de los individuos con AR se detecta una alta expresión del gen TNF- α en las articulaciones afectadas, además de tener el factor de necrosis tumoral y factor reumatoide (FR) elevados en plasma (Kawane *et al.*, 2006). Nemeč *et al.*, 2008 comenta en su trabajo el importante papel que juega TNF- α en el apareamiento y actividad de la artritis reumatoide y que los elevados niveles de TNF- α en el plasma y líquidos sinoviales de pacientes con AR, pueden

estar relacionados con polimorfismos en la región promotora del gen. En los últimos años, varios polimorfismos en esta región promotora han sido estudiados (tales como TNF- α -308 y -238) y se ha hipotetizado su papel en el incremento de la predisposición o actividad de la enfermedad, resistencia al tratamiento con inhibidores de TNF o una mayor incidencia, posiblemente debido a un desbalance de los niveles de la proteína TNF- α que podría favorecer el apareamiento o la actividad de la AR (O'Rielly *et al*, 2009; Rezaieyazdi *et al*, 2007; Cuenca *et al*, 2001).

Sin embargo, los resultados obtenidos siguen siendo controversiales. Al momento no existe bibliografía clara en relación con la presencia de estos polimorfismos y la AR, Sin embargo, varios estudios los han relacionado con la susceptibilidad a la enfermedad en distintos grupos de pacientes y en algunos casos con implicaciones étnicas (Cuenca *et al.*, 2003; Yen *et al.*, 2001; Vinasco *et al.*, 1997).

Con estos antecedentes, el objetivo de este estudio preliminar fue determinar la relación entre los polimorfismos -308 y -238 en el promotor del gen TNF- α y la presencia y actividad de la artritis reumatoide.

MATERIALES Y MÉTODOS

El modelo del estudio fue de caso y controles. Al ser un proyecto piloto, se incluyeron en la población cuarenta pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide (ACR 1987) y los controles

fueron veinticinco individuos sin AR. Los criterios de inclusión, fueron: edad mayor a 18 años, no hayan tenido transfusiones sanguíneas en los 6 meses previos al estudio y que tengan un marcador de artritis positivo. Cada participante firmó un consentimiento informado donde se le explicó todo lo concerniente al estudio. Además, se incluyó un cuestionario con datos clínicos de cada participante con el objetivo de calcular el índice DAS 28.

El factor reumatoide (FR) se determinó mediante la técnica de micro-ELISA, con el procedimiento descrito por el kit comercial DIAMEDIX (Miami, USA) (valor positivo > 20.0 IU/ml, valor negativo < 16 IU/ml). Proteína C reactiva (RCP) se determinó con el uso del equipo Vitros DT60 II Chemistry system (Johnson & Johnson), (valor positivo > 4.5 mg/L). Los anticuerpos anti-Péptido citrulinado cíclico (anti-CCP), se realizaron mediante el kit de HUMAN (Wiesbaden, Alemania) (valor normal hasta 25 U/ml) y la prueba para medir el factor de necrosis tumoral (TNF- α), se realizó con el método descrito en el kit comercial de la casa IBL (Hamburgo, Alemania), con valor negativo < 3.8 pg/ml.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 200 μ l de sangre total-EDTA, con el uso del kit HighPure PCR template preparation (Roche). La detección de los polimorfismos se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP-RT) con el método (*endpoint genotyping*) del sistema Lightcycler 2.0 (Roche). La mezcla de

reacción se preparó en un volumen final de 20 μ l, con el empleo de los iniciadores descritos por Azmy y colaboradores, 2004 (Tabla 1). Se colocaron 4 μ l de Master Plus HybProbe (Roche), 0.2 μ M – 0.4 μ M (Roche) de cada iniciador (Tabla 1) y 5 μ l de ADN genómico (50–100 ng).

Tabla 1
 Iniciadores descritos por Azmy *et al.*, 2004

Indicadores	Secuencia (5' - 3')	*Concentración final
F308	GGCCACTGACTGATTTGTGTGT	0.4 μ M
R308	CAAAGAAATGGAGGCAATAGGTT	0.4 μ M
S308FAM	6-FAM-AACCCCGTCTCATGCCCC-TMR	0.2 μ M
S308TET	TET-ACCCCGTCCCATGCCCC-TMR	0.4 μ M
F238	GCATCAAGGATACCCCTCACA	0.4 μ M
R238	ATCAGTCAGTGGCCCAGAAGA	0.4 μ M
S238FAM	6-FAM-TCCTCCCTGCTCTGATTCCGA-TMR	0.2 μ M
S238TET	TET-CCTCCCTGCTCCGATTCCG-TMR	0.4 μ M

*Se destaca la concentración de iniciadores usada en este estudio

El perfil térmico usado fue de 95° C por 10 minutos, para la denaturación inicial, 45 ciclos de 95° C por 15 segundos, para la denaturación, 61° C por 10 segundos para el anillamiento, y 72° C por 15 segundos, para la extensión. La adquisición de fluorescencia (única) se realizó en el paso de anillamiento de los ciclos.

Para medir la actividad de la artritis reumatoide empleó el índice DAS 28 (Inoue *et al.*, 2007) que incluye la evaluación del dolor e inflamación en 28 articulaciones y el resultado de la prueba de la proteína C reactiva (28-joint disease activity score) con la fórmula:

$$\text{DAS28 (3)} = [0.56 \sqrt{\text{NAD28}} + 0.28 \sqrt{\text{NAT28}} + 0.36 \ln(\text{PCR}+1)] (1.10+1.15).$$

Donde: NAD es el número de articulaciones dolorosas, NAT es el número de articulaciones dolorosas y tumefactas y PCR representa la proteína C reactiva. Los datos obtenidos fueron categorizados como Remisión < 2.3; actividad Leve (SB DAS 28) < 2.7; actividad moderada (SM DAS 28) > 2.7 y \leq 4.1; actividad severa (SA DAS 28) > 4.1.

Se realizó un cálculo de Kruskal Wallis ($P < 0.05$) entre los casos y controles. Adicionalmente, se realizó el mismo test para los polimorfismos genéticos y la actividad de la enfermedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 40 pacientes, el 57.5 % tiene actividad baja de la enfermedad, 40 % moderada y únicamente 2.5 % actividad alta, según los valores de DAS 28 (Tabla 2). La relación entre los polimorfismos estudiados en el grupo control y los participantes con artritis, así como la actividad, de la enfermedad no indicaron significación estadística mediante el test de Kruskal-Wallis ($P > 0.05$). Este resultado fue previsible de acuerdo con la bibliografía y por el tamaño de la población incluida en el estudio, por lo cual concuerda con otros estudios (Rezaieyazdi *et al.*, 2007, Brinkman *et al.*, 1997) y sugiere que son factores distintos a los incluidos en el estudio los que se encuentran relacionados con la predisposición y la actividad de la enfermedad.

El número de participantes limitó la búsqueda de asociaciones específicas entre los genotipos de cada polimorfismo y características definidas de la enfermedad. Sin embargo, el mayor porcentaje (69 %) de individuos con polimorfismo -238GA tuvieron baja actividad de la enfermedad (según DAS 28), lo cual indica su posible asociación. Mientras que, la mayoría de individuos con los polimorfismos -238AA (57 %) y -238GG (67 %) presentaron actividad media (Tabla 2). Este resultado concuerda con el trabajo de Brinkman *et al.*, 1997, donde se sugiere que el genotipo -238GG en coordinación con otros factores, tales como varios genes del complejo mayor de histocompatibilidad se encuentra relacionados con un mayor grado de la enfermedad.

Tabla 2

Frecuencias fenotípicas de pacientes con Artritis reumatoide (AR) y participantes control, Porcentajes de DAS 28 de pacientes con AR y promedio de datos clínicos de pacientes con AR

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS	-238			-308		
	-238GG	-238GA	-238AA	-308GG	-308GA	308AA
Pacientes AR (40)	6	26	7	5	27	7
Participantes control (25)	0	20	5	0	21	4
* PORCENTAJE DAS 28 DE PACIENTES CON AR						
SA DAS 28	0 %	4 %	0 %	0 %	4 %	0 %
SM DAS 28	67 %	27 %	57 %	40 %	40 %	29 %
SB DAS 28	33 %	69 %	43 %	60 %	56 %	71 %
PROMEDIO DE DATOS CLÍNICOS DE PACIENTES CON AR						
Edad (años)	48.8	46	48.86	39.2	48.07	48.29
TNF- α (pg/ml)	3.25	2.9	3.11	3.56	3.06	2.8
CCP (U/ml)	132.2	186.36	230.56	244.18	190.36	127.4
FR (IU/ml)	117.1	121.7	98.42	213.46	105.15	84.2
PCR (mg/L)	21.25	34.22	12.3	67.7	24.39	15.14

AR, artritis reumatoide, TNF- α , factor de necrosis tumoral; CCP, proteína anticitrulinada; FR, factor reumatoide; CRP, Proteína C reactiva.*DAS 28, índice de actividad de la artritis reumatoide en base al dolor y la inflamación en 28 articulaciones y el resultado de la prueba de proteína C reactiva; SA DAS 28, actividad alta; SM DAS 28, actividad media; SB DAS 28, actividad baja. Las pruebas genotípicas fueron realizadas por RCP en tiempo real por el método de *endpoint genotyping*. Las pruebas inmunológicas fueron realizadas por el método de ELISA.

Además, los datos de los polimorfismos -308, no sugieren un patrón similar al -238, El genotipo -308GG mostró un promedio mayor que otros genotipos (-308GA y -308AA) en los tres marcadores de artritis (RF, CCP y CRP). Sin embargo, al correlacionar los datos clínicos con la presencia de los genotipos no se demostró significación estadística (Tabla 2). De manera congruente con otros estudios (Rezaieyazdi *et al.*, 2007; Pawlik *et al.*, 2005; Brinkman *et al.*, 1997), estos resultados proponen que el polimorfismo -308 no es un factor determinante para la actividad a la artritis reumatoide.

Un factor importante que no fue analizado en el presente estudio, fue la posible asociación entre los polimorfismos del gen TNF- α y alelos específicos de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad. Algunas variantes de genes de clase II de este complejo, han sido asociadas con actividad o susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, los alelos del gen HLA-DRB1 que comparten la secuencia de aminoácidos (QKRAA, QRRRAA or RRRRAA) en la posición 70-74, han sido reportados entre los principales factores de riesgo genético para artritis reumatoide (Newton *et al.*, 2004).

Esta asociación entre alelos de TNF- α y HLA-DR es de gran importancia ya que se ha sugerido que la relación con la progresión de la enfermedad de algunos genes, puede estar relacionada con un fenómeno de desequilibrio del ligamiento (*linkage disequilibrium*) entre el HLA-DRB

y otros genes (Silman y Pearson, 2002). En este contexto, es importante continuar la búsqueda de múltiples factores asociados con esta patología y ver como se relacionan entre ellos.

Los resultados de este estudio se presentan de manera preliminar, debido a la necesidad de considerar factores tanto genéticos como ambientales (Silman y Pearson, 2002) e integrar nuevas variables en una población mayor, para alcanzar un resultado concluyente que nos permita comprender las diferencias en la progresión y susceptibilidad de los pacientes a la artritis reumatoide. En este sentido, continuaremos con el análisis de pacientes con AR e individuos control para los polimorfismos -308 y -238 en el promotor del gen TNF- α y adicionaremos el estudio de la región HLA-DR4, al igual que los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile del gen Toll4, con el fin de correlacionar esta información genética con los datos clínicos de individuos de una población de estudio más grande a fin de poder establecer el perfil de distribución de frecuencias de estos polimorfismos en la población ecuatoriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azmy I, Balasubramanian SP, Wilson AG, Stephenson TJ, Cox A, Brown NJ y Reed MWR. 2004. Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Research*, 6: R395-400.

- Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, Van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, Breedveld FC y Verweij CL. 1997. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease. *British Journal of Rheumatology*, **36**: 516–21.
- Cuenca J, Pérez CA, Aguirre AJ, Schiattino I y Aguillón JC. 2001. Genetic polymorphism at position-308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population. *Biological Research*, **34**(3–4): 237–41.
- Cuenca J, Cuchacovich M, Ferreira L, Pérez C, Aguirre A, Schiattino I *et al.* 2003. The -308 polymorphism in the tumor necrosis factor gene promoter region and ex-vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, **42**: 308–13.
- Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID y Roberts DF. 1989. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clinical Genetics*, **36**: 178–82.
- González A, Nicovani S, Massardo L, Aguirre V, Cervilla V, Lanchbury JS *et al.* 1997. Influence of the HLA-DR β shared epitope on susceptibility to and clinical expression of rheumatoid arthritis in Chilean patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **56**: 191–3.
- Inoue E, Yamanaka H, Hara M, Tomatsu T y Kamatani N. 2007. Comparison of disease activity score (das)28-erythrocyte sedimentation rate and das28- C-reactive protein threshold values. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **66**: 407–409.
- John S, Shephard N, Liu G, Zeggini E, Cao M y Chen W. 2004. Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites. *American Journal of Human Genetics*, **75**: 54–64.
- Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, Yoshikawa H y Nagata S. 2006. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*, **443**: 998–1002.
- Lee YH, Bae SC y Song GG. 2012. TNF promoter -308 A/G and -238 A/G polymorphisms and juvenile idiopathic arthritis: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, **39**(8): 8497–8503.
- MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J y Aho K. 2000. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.

- Arthritis & Rheumatism*, **43**: 30–7.
- Majithia V y Geraci SA. 2007. "Rheumatoid arthritis: diagnosis and management". *American Journal of Medicine*, **120**(11): 936–9.
- Mestanza M, Zurita C y Armijos R. 2006. Prevalence of rheumatic diseases in a rural community in Ecuador. A community oriented program for control of rheumatic disorders (Copcord). *Journal of clinical Rheumatology*, **12**(4): S6.
- Nemec P, Pavkova-Goldbergova M, Stouracova M, Vasku A, Soucek M y Gatterova J. 2008. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population. *Clinical Rheumatology*, **27**(1): 59–65.
- Nepom GT. 2001. The role of the DR4 shared epitope in selection and commitment of autoimmune T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, **27**: 305–16.
- Newton JL, Harney SMJ, Wordsworth BP y Brown MA. 2004. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes and Immunity*, **5**: 151–157.
- O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A y Rahman P. 2009. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *The Pharmacogenomics Journal*, **9**(3): 161–7.
- Osorio YF, Bukulmez H, Petit-Teixeira E, Michou L, Pierlot C, Cailleau-Moindrault S, et al. 2004. Dense genome-wide linkage analysis of rheumatoid arthritis, including covariates. *Arthritis & Rheumatism*, **50**: 2757–65.
- Pawlik A, Florczak M, Ostanek L, Brzosko M, Brzosko I y Szklarz BG. 2005. TNF-alpha -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, **34**: 22–6.
- Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Sandooghi M y Mohajer F. 2007. Tumour necrosis factor a -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, **28**(2): 189–91.
- Silman AJ y Pearson JE. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, **4 Suppl 3**: S265–72.
- Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, et al. 2005. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Human Molecular Genetics*, **14**: 2305–21.

- Verwij C. 1999. Tumor necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **58**(Supl I): 120–6.
- Vinasco J, Beraún Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E, *et al.* 1997. Polymorphisms at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, **49**: 74–8.
- Yen J, Chen CH, Tsai W, Lin CH, Ou T y Wu CC. 2001. Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *The Journal of Rheumatology*, **28**: 1788–92.