

Artículo original

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN PD-1 (PD-1.3G/A) CON EL DESARROLLO DE HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO 1 EN POBLACIÓN MESTIZA VENEZOLANA

María del Pilar Fortes¹, Paolo Tassinari¹, Irma Machado¹

1. Instituto de Inmunología Dr. Nicolás E Bianco C, FOCIS Center of Excellence, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

Introducción: la Hepatitis Autoinmune (HAI) es una enfermedad hepática progresiva en la cual se demuestra susceptibilidad genética. La molécula PD-1, inhibitoria, actúa como receptor de superficie. Uno de los SNPs, PD-1.3G/A ha sido asociado con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Hallazgos experimentales sugieren, que PD-1 puede jugar un papel importante en el desarrollo de las enfermedades hepáticas autoinmunes. **Objetivo:** determinar el polimorfismo del gen PD-1 (PD-1.3 G/A) y su posible asociación con HAI tipo 1 en pacientes mestizos venezolanos. **Metodología:** se estudiaron 70 pacientes con HAI tipo 1 y 120 individuos sanos, ambos grupos venezolanos de tercera generación. La determinación del polimorfismo se realizó mediante la técnica de PCR usando iniciadores de oligonucleótidos específicos seguida por digestión de enzimas de restricción (PstI). **Resultados:** el alelo más frecuente en las dos poblaciones correspondió al alelo silvestre G (92,9% y 95,4%) con frecuencias muy similares. El genotipo más frecuente fue el genotipo homocigoto silvestre (G/G) tanto en pacientes como en controles (87,2% y 90,8%, $p=0,42$) observándose mayor valor en el segundo grupo. El genotipo G/A se aprecia con mayor frecuencia en pacientes (11,4% vs 9,2%, $p=0,62$). El genotipo homocigoto A/A sólo estuvo presente en un paciente y en ningún control (1,4% vs 0%, $p=0,19$). Ninguna de estas diferencias fue significativas. **Conclusión:** no se encontró diferencia en la distribución de genotipos del gen PD-1 (PD-1.3G/A) observados en pacientes e individuos sanos, sugiriendo que en nuestra población la susceptibilidad para HAI tipo 1 no está influenciada por el polimorfismo de este gen.

Palabras Clave: Hepatitis autoinmune tipo 1, PD-1, mestizos venezolanos.

Recibido: 30 de junio de 2015

Aceptado: 1 de septiembre de 2016

Correspondencia: igleforts@gmail.com

ASSOCIATION OF THE PD-1 (PD-1.3G/A) GENE POLYMORPHISM WITH THE DEVELOPMENT OF TYPE 1 AUTOIMMUNE HEPATITIS IN VENEZUELAN MESTIZO POPULATION

ABSTRACT

Introduction: Autoimmune hepatitis (AIH) is a progressive liver disease showing genetic susceptibility. The inhibitory PD-1 molecule acts as a surface receptor. One of the SNPs, PD-1.3G/A has been associated with susceptibility to autoimmune diseases. Experimental findings suggest that PD-1 may play an important role in the development of autoimmune liver pathologies. **Objective:** to establish the *PD-1* gene polymorphism (PD-1.3 G/A) and its potential association to type 1 AIH in Venezuelan mestizo patients. **Methodology:** 70 patients with type 1 AIH and 120 healthy individuals were studied, both groups being third generation Venezuelans. The determination of the polymorphisms was done through PCR, using specific oligonucleotide initiators followed by restriction enzyme digestion (*Pst*I). **Results:** the most frequent allele in both population groups was the wild G allele (92.9% and 95.4%) with very similar frequencies. The most frequent phenotype was the wild homozygote genotype (G/G), both in patients and controls (87.2% and 90.8%, $p=0.42$) with higher values observed in the second group. The G/A genotype is more often found among patients (11.4% vs 9.2%, $p=0.62$). The A/A homozygote genotype was only present in one patient and in none of the controls (1.4% vs 0%, $p=0.19$). None of these differences was significant. **Conclusion:** no difference was found in the genotype distribution of the *PD-1* gene (PD-1.3G/A) observed in patients and healthy individuals, which suggests that in our population the susceptibility for Type 1 AIH is not affected by this gene's polymorphism.

Keywords: Type 1 autoimmune hepatitis, PD-1, Venezuelan mestizos.

INTRODUCCIÓN

La Hepatitis Autoinmune (HAI) tipo 1 es una enfermedad inflamatoria del hígado, que afecta principalmente a mujeres y que se caracteriza por elevación de aminotransferasas, presencia de autoanticuerpos e hipergammaglobulinemia (1). Los estudios inmunohistoquímicos identifican en forma predominante los linfocitos T, principalmente los linfocitos T CD4+ y en menor cuantía los linfocitos T CD8+ (2), lo cual sugiere que estas células son las que más contribuyen a la inmunopatogenia de esta enfermedad. No están claras las razones que provocan la ruptura de tolerancia y los mecanismos que causan la enfermedad. La hipótesis más comúnmente aceptada es que esta patología es desencadenada por un factor ambiental en un individuo genéticamente susceptible (3). Múltiples genes pueden interactuar produciendo el llamado "pool de genes permisivos" que determinan tanto el riesgo como las características clínicas de la

enfermedad (3). La mayoría de los estudios realizados han asociado la HAI tipo 1 con el Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) o Antígeno Leucocitario Humano (HLA) clase II.

Las evidencias demuestran que, además de los determinantes compartidos de moléculas HLA clase II, que juegan un papel prevalente en la susceptibilidad hacia la enfermedad, múltiples promotores genéticos de autoinmunidad están presentes en HAI y pueden incluir tanto genes dependientes como independientes del CPH (1), reportándose al menos un 30 a 50% de los pacientes con HAI sin asociación con alelos HLA de susceptibilidad (1). En el estudio realizado por nosotros (4), se apreció que un 38% de los pacientes no presentaban alelos HLA de susceptibilidad.

En cuanto a los genes que se encuentran fuera del CPH es importante estudiar aquellos que regulan la función del linfocito T, linfocito ampliamente involucrado en la inmunopatogenia de la HAI (5). De estos genes unos de

los más importantes son los que codifican la proteína: PD-1 (muerte celular programada-1).

PD1 (muerte celular programada-1)

Es una molécula glicosilada de 50-55 kilodaltons, que actúa como receptor de superficie y pertenece a la familia de CD28. Se trata de un receptor cuya expresión es inducida luego de la activación de células T. PD-1 se expresa en células T, células B y células mieloides (6). El ligando PD-L1 está presente en forma constitutiva en células T, B, macrófagos y células dendríticas, incrementándose su expresión luego de la activación de estas células. PD-L1 se ha detectado además en tejidos no linfoides como: corazón, placenta, pulmón e hígado (células de Kupffer). Mientras que PD-L2 se expresa más selectivamente en macrófagos activados y células dendríticas y puede inducirse vía IL-4. La unión de PD-1 a sus ligandos produce inhibición de la proliferación de células T, células B y de la producción de citocinas TH1 (7,8-10), por lo que se ha postulado que juega un importante papel en la inducción y/o mantenimiento de la tolerancia periférica. La expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en humanos, ha sido demostrada en biopsias de hígados con enfermedades hepáticas autoinmunes: HAI y Cirrosis Biliar Primaria (CBP) (11,12), reforzando el papel que juega esta molécula en el mantenimiento de la tolerancia del hígado. En el gen *PD-1* humano, localizado en el cromosoma 2 (región 2q37) (13), se han identificado más de treinta polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Uno de los SNPs, PD-1.3G/A (posición 7146) ha sido asociado con susceptibilidad a LES en suecos, americanos europeos y familias mejicanas (14,15). En un estudio español con pacientes lúpicos este alelo se asoció con un efecto protector (16). También, se han asociado otras enfermedades autoinmunes con la presencia del PD-1.3G/A como Artritis Reumatoidea (17), Diabetes tipo 1 (18) y Espondilitis Anquilosante (19). Hasta los momentos no se ha estudiado la asociación de los polimorfismos de este gen en HAI.

Puesto que se ha demostrado que el polimorfismo del gen de la molécula de muerte celular programada-1 (PD-1.3G/A) ha sido relacionado con diversas enfermedades

autoinmunes y hay evidencias que la molécula PD-1 participa en la patogenia de enfermedades hepáticas, proponemos que, probablemente, el polimorfismo de este gen esté asociada a la susceptibilidad y a las características clínicas en los pacientes mestizos venezolanos con HAI tipo 1.

En estudios previos (4), hemos demostrado que hay una susceptibilidad genética en los pacientes mestizos venezolanos asociada a HLA clase II; sin embargo, una proporción de pacientes no tienen esta asociación, por lo que nos propusimos estudiar otros genes relacionados con la regulación del linfocito T (principal célula en la patogenia de la enfermedad), con la finalidad de conocer aún más otros aspectos inmunológicos de la HAI en miras de un mejor conocimiento de esta patología, lo que podría implicar posibles proyecciones terapéuticas.

El objetivo general de este estudio es determinar la asociación del polimorfismo del gen *PD-1* (PD-1.3G/A) y la presencia de HAI tipo1 en pacientes mestizos venezolanos.

METODOLOGÍA

Este es un estudio observacional analítico de casos y controles no-pareado.

El muestreo de los pacientes fue hecho de forma no probabilística por conveniencia. Se estudiaron 70 pacientes con HAI tipo 1 venezolanos de tercera generación que procedieron de las consultas de médicos gastroenterólogos del medio privado: Policlínica Metropolitana, Hospital de Clínicas Caracas, Instituto Médico La Floresta, Clínica Panamericana y del medio hospitalario: Hospital José María Vargas, Hospital Clínico Universitario, Hospital J.M. de los Ríos, Hospital Domingo Luciani y así como de la Consulta de Inmunogastroenterología del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela, previa aprobación del comité de Bioética del Instituto de Inmunología. Los pacientes debían reunir los criterios diagnósticos establecidos internacionalmente para Hepatitis Autoinmune (International Autoimmune Hepatitis Group) (1).

Los pacientes provienen de cualquier región del país y cada uno de los pacientes firmaron el consentimiento para la participación en este estudio.

Controles

El grupo control lo integran 120 individuos cuyas muestras provienen del banco de muestras de donantes sanos de cualquier región del país de la Sección de Inmunogenética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela. Los individuos controles son sanos, no relacionados entre sí y venezolanos de nacimiento, con padres y abuelos venezolanos.

Encuesta

Se realizó una breve encuesta a cada paciente donde se tomaron los datos personales y se hizo énfasis del origen familiar como mínimo en las dos últimas generaciones.

Historia Médica

Se tomaron de las historias médicas los datos clínicos (edad, enfermedades autoinmunes asociadas y respuesta al tratamiento) y de laboratorio (bioquímico, inmunoserológico y reporte de biopsias hepáticas) de cada paciente.

Purificación de ADN

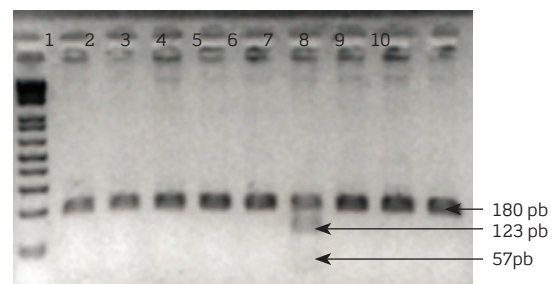
La obtención del ADN de cada individuo se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el método descrito previamente en nuestro laboratorio (4).

Determinación del polimorfismo PD-1.3 G/A

Se siguió el siguiente protocolo (21): tenía 100 µg/ml de ADN genómico, 2.5 mM de MgCl₂, Buffer 1X, 0.2 mM de la mezcla nucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 0.1 mM de cada iniciador (sentido: 5'-CCCCAGGCAGCAACCTCAAT-3', antisentido: 5' GACCGCAGGCAGGCACATAT-3'). Esta mezcla se llevó a un termociclador que se programó con las siguientes condiciones de PCR: 1 ciclo (94°C por 10 min), 33 ciclos (94°C por 15 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 15 seg) y 1 ciclo (72°C por 5 min). Después de visualizar el amplificado (fragmento de 180 bp) en gel de agarosa al 3%, el producto de la PCR se incubó con la enzima de

restricción PstI por 16 horas a 37°C. Seguidamente se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 3% que contenía bromuro de etidio. Finalizada la corrida, el gel se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta y se documentó por fotografía. La digestión del producto de PCR genera tres fragmentos de 180, 123 y 56 pb (Sólo se visualizan los dos primeros) para el genotipo heterocigoto (G/A). En el homocigoto común G/G hay ausencia del sitio de reconocimiento para la enzima, por lo que no hay digestión del amplicón y en el homocigoto A/A el patrón de corte genera dos bandas, de 123 y 57pb (se visualiza la primera banda) (Figura 1).

FIGURA 1. Visualización de los fragmentos PCR-RFLP de PD1.3 G/A



Productos amplificados para este sitio polimórfico, digeridos con la enzima PstI en un gel de agarosa al 3%. En el pozo número 1 se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb. En el pozo 7 se visualizan las bandas que corresponden al genotipo heterocigoto G/A, en el resto de los pozos se observan el resultado de la digestión correspondiente al genotipo homocigoto G/G, el cual carece del sitio de restricción y por tanto no hay corte del producto amplificado.

Análisis Estadístico

Las frecuencias alélicas (FA) y genotípicas (FG) se calcularon mediante conteo directo. La FA es una proporción, que generalmente se expresa como frecuencia x 1000, y se calcula dividiendo el número de veces en que aparece el alelo en el grupo estudiado, dividido por el número total de cromosomas estudiados en el mismo grupo, es decir el doble del número de individuos estudiados. La FG se

calculó dividiendo el número de veces en que aparece el genotipo en el grupo estudiado, dividido por el número total de individuos en el mismo grupo. Ambas frecuencias se calcularon en porcentajes. El nivel de significancia (p) de la asociación con hepatitis autoinmune y el polimorfismo del gen en estudio presente en pacientes y controles se determinó con el estadístico Ji cuadrado (χ^2) (22). La prueba χ^2 también se utilizó para determinar si hubo dependencia entre las características clínicas de los pacientes y las frecuencias de genotipos. El riesgo relativo se calculó como "odds ratio" (OR) mediante la fórmula de Woolf y modificada por el método descrito por Haldane (22) cuando un elemento de la ecuación es igual a cero. Se determinaron las frecuencias de Hardy-Weinberg del polimorfismo estudiado, en la población de casos y controles.

RESULTADOS

Se analizó un total de 70 pacientes mestizos venezolanos (provenientes de diferentes regiones del país), con una edad comprendida entre 8 y 70 años (promedio de 32,7 años). Sesenta pacientes (85,7%) eran del sexo femenino. Todos los pacientes cumplieron los criterios clínicos, bioquímicos e inmunoserológicos para la clasificación de HAI tipo 1. Ningún paciente reportó serología positiva para hepatitis viral, ni toxicidad por alcohol o drogas.

Un total de 120 individuos mestizos venezolanos sanos y no relacionados fueron tomados como controles, provenientes de todo el país de manera similar a los pacientes, con una edad comprendida entre 1 y 76 años (promedio 29,3 años). Sesenta y dos (51,6%) eran del sexo femenino.

En vista que la frecuencia del sexo femenino en pacientes era mayor que en el grupo control siendo esta diferencia significativa desde el punto de vista estadístico (85,7% vs 51,6%, $p=0,000$), quisimos descartar la influencia del sexo en nuestro estudio mediante el análisis de la frecuencia genotípica del polimorfismo en estudio entre hombres y mujeres del grupo control y no encontramos diferencias de la distribución genotípica que fuera significativa. (PD-1 G/G: Mujeres: 60 (50%), Hombres: 56

(46,6%) $p=0,60$; G/A: Mujeres: 2 (1,7%), Hombres: 2 (1,7%) $p=1$).

Polimorfismo PD-1.3G/A

El alelo más frecuente en las dos poblaciones correspondió al alelo silvestre G (92,9% y 95,4%, $p=0,293$) con frecuencias muy similares. En los pacientes se aprecian los tres genotipos posibles y en los individuos sanos no se evidenció el genotipo homocigoto mutado (A/A). El genotipo más frecuente fue el genotipo homocigoto silvestre (G/G) tanto en pacientes como en controles (87,2% y 90,8%, OR: 0,684 IC95% (0,27-1,74), $p=0,42$) observándose mayor valor en el segundo grupo, sin diferencia estadísticamente significativa. El genotipo G/A se aprecia con mayor frecuencia en pacientes (11,4% vs 9,2%, OR: 1,279 IC95% (0,49-3,35), $p=0,62$) sin diferencia significativa. El genotipo homocigoto A/A sólo estuvo presente en un paciente y en ningún control no siendo significativa esta diferencia (1,4% vs 0%; OR: 5,201 IC95%:0,21-129,4, $p=0,19$) (Tabla 2).

TABLA 1. FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL POLIMORFISMO DEL GEN PD-1 (PD-1,3G/A) EN PACIENTES CON HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO 1 E INDIVIDUOS SANOS

Alelos	Casos n (%)	Controles n (%)	P
G	92,9(130)	95,4 (229)	0,293
A	7,1(10)	4,6 (11)	

TABLA 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS PD-1 (PD-1,3G/A) EN PACIENTES CON HAI E INDIVIDUOS SANOS

Genotipos	Grupo Pacientes n=70	Grupo Control n=120	OR IC95%	p
G/G	61 (87,2%)	109 (90,8%)	0,684 (0,27-1,74)	0,42
G/A	8 (11,4%)	11 (9,2%)	1,279 (0,49-3,35)	0,62
A/A	1 (1,4%)	0	5,201 (0,21-129,4)	0,19

El análisis del Ji-cuadrado (χ^2) para establecer si la población se encontraba en EHW mostró que no lo estaban para los casos ($\chi^2=67,84$) ni para los controles ($\chi^2=158,9$).

Características clínicas de los pacientes y su posible asociación con la presencia de los polimorfismos susceptibles

En la Tabla 3 se resumen las características clínicas de los pacientes, observándose además los parámetros bioquímicos y los inmunoserológicos. Las enfermedades autoinmunes concomitantes que se observaron fueron: tiroiditis autoinmune (7,9%), vasculitis (6,3%), LES (3,2%), rectocolitis ulcerativa (3,2%), síndrome antifosfolípido (1,6%), anemia hemolítica (1,6%) y síndrome de superposición con CBP (11,1%). El 56,4% de las biopsias de los pacientes reportaron cirrosis hepática.

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS DE MESTIZOS VENEZOLANOS CON HAI TIPO 1

Parámetros clínicos	Pacientes (n=70)
Edad (años) ^a	32,7 (8 - 70)
Sexo (femenino/masculino)	60 (85,7%) / 10(14,3%)
Enfermedades autoinmunes asociadas 18 (25,7%)	
Parámetros bioquímicos	
AST (normal, < 40 UI/L) ^a	630,8 (34 - 2102)
ALT (normal, < 36 UI/L) ^a	648,8 (28- 2332)
FA (normal, < 136 UI/L, niños < 450 UI/L) ^a	411,2 (56 - 1940)
BT (normal, < 1.3 mg/dl) ^a	7,3 (0,44 - 69)
Globulina (normal, < 3,5 g/dl) ^a	4,5 (2,1 - 9)
Parámetros inmunoserológicos	
IgG (normal, < 1621 mg/dl) ^a	3379,3 (1330 - 7100)
IgA (normal, < 387 mg/dl) ^a	337,1 (17 - 650)
IgM (normal, < 200 mg/dl) ^a	257,5 (79 - 958)
ANA ^b	45,7
SMA ^b	54,3
ANA + SMA ^b	45,7
AMA ^b	5,7
LKM-1 ^b	0

HAI=hepatitis autoinmune; AST= aspartatoaminotransferasa; ALT= alaninoaminotransferasa; GGT=gamma-glutamyl-transferasa; BT= Bilirrubina total; Ig= Inmunoglobulina; ANA= anticuerpos antinucleares; SMA= anticuerpo anti músculo liso; AMA= anticuerpo antimitocondrial; LKM-1= anticuerpo microsomal tipo 1 hígado/riñón. ^a= expresado como media aritmética; ^b= expresado como porcentaje; entre paréntesis valores mínimos y máximos

Al evaluar la respuesta al tratamiento se evidenció que el 42,9% presentaron una respuesta completa, 40% respuesta incompleta, 14,3% falla al tratamiento y 5,7% recaída. No se encontró ninguna asociación de los genotipos del gen en estudio y las características clínicas particulares de cada paciente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

No encontramos en la población mestiza venezolana con HAI tipo 1 susceptibilidad genética asociada al polimorfismo PD-1.3G/A. Este polimorfismo se ha asociado con autoinmunidad en diversos grupos étnicos. Diferentes investigaciones han encontrado asociación de LES y aumento de frecuencia del alelo A en suecos, americanos europeos y mejicanos (14,15); sin embargo, en españoles este alelo proporciona un efecto protector para esta patología (16). También se ha encontrado asociación con Artritis Reumatoidea (17), Diabetes tipo 1 (18) y Espondilitis Anquilosante (19). La discordancia observada en la población caucásica en cuanto a la asociación de este polimorfismo con la susceptibilidad para desarrollar LES, hizo que el grupo de Ferreiros-Vidal (23) estudiara la distribución del SNP PD-1.3G/A en diferentes poblaciones europeas, observando una mayor frecuencia del alelo A en españoles sanos con un promedio del 15% (reportándose valores de 11,2% en Santiago y 10,1% en Granada), mientras que la menor frecuencia la posee los países escandinavos (~ 6%). Datos previos (24,25) también mostraron que la distribución de este polimorfismo varía en poblaciones de diferentes continentes: es prácticamente cero en poblaciones asiáticas y poco frecuente en poblaciones africanas.

Al analizar nuestros resultados, llama la atención que la frecuencia fenotípica del alelo mutado A (9,2%) es similar a la reportada por los españoles (23). Podríamos plantear que el alto grado de mestizaje en Venezuela, con gran influencia de la población española (26), explicaría la alta frecuencia observada del genotipo heterocigoto (G/A) en nuestra población sana, lo que contribuiría a la no asociación de esta variante alélica con la presencia de HAI y esto está reforzado por el hecho que nuestra población, tanto casos como controles no se encuentran

en EHW. Este estudio refuerza la importancia de que la heterogeneidad genética de una población dada, puede hacerla susceptible o no al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Sería interesante conocer el comportamiento del polimorfismo PD-1.3G/A en relación a la enfermedad en otras etnias.

La HAI es un trastorno donde el balance entre la respuesta inflamatoria y la respuesta reguladora es crítico para definir su aparición y progresión, por lo que no se descarta que estudios adicionales puedan aclarar la posible asociación de otras variantes de *PD-1* en su patogénesis.

FINANCIAMIENTO

Trabajo financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) N° PG-09-00-6711-2007 y el Centro Nacional de Referencia en Inmunología Clínica e Inmunología Asociación Civil.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

1. Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev* 2000;174:250-9.
2. Senaldi G, Portmann B, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis. *Archi Dis Child* 1992;67:1447-53.
3. Donaldson PT. Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002;22(4): 353-63.
4. Fortes MP, Machado IV, Gil GC, Fernández-Mestre M, Dagher L, León R, Bianco N.E, et al. Genetic contribution of major histocompatibility complex class II region to type 1 autoimmune hepatitis susceptibility in Venezuela. *Liver International* 2007;27: 1409-16.
5. Donaldson PT, Czaja AJ. Genetic effects on susceptibility, clinical expression, and treatment outcome of type I autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002;6:707-25.
6. Zhang X, Schwartz JC, Guo X, Bhatia S, Cao E, Lorenz M et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity* 2004;20(3):337-47.
7. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO* 1992;11:3887-95.
8. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H et al. Engagement of the Pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1027-34.
9. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2947-53.
10. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proct Natl AcadSci USA* 2004;101:17174-79.
11. Oikawa T, Takahashi H, Ishikawa T, Hokari A, Otsuki N et al. Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1, and its ligands in autoimmune liver disease. *PatholInt* 2007;57(8):485-92.
12. Mataki N, Kikuchi K, Kawai T, Higashiyama M, Okada Y et al. *Am J Gastroenterol* 2007;102(2):302-12.
13. Finger LR, Pu J, Wasserman R, Vibhakar R, Louie E, Hardy RR et al. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. *Gene* 1997;197:177-87.
14. Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002;32:666-9.
15. Velázquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, Carreño-Manjarrez R, Solís-Vallejo E, López-Lara ND et al. Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J HumGenet* 2007;15(3):336-41.

16. Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino J, Barros F, Carracedo A, Carreira P, González-Escribano F. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumat* 2004;50(8):2590-7.
17. Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de Faire U, Wiman B, Prince J et al. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor the shared epitope. *Arthritis Rheum* 2004;50(6):1770-3.
18. Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type I diabetes. *Tissue Antigens* 2003;62(6):492-7.
19. Lee SH, Lee YA, Woo DH, Song R, Park EK, Ryu MH et al. Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res Ther* 2006;8(6):R163.
20. Czaja AJ, Donaldson PT. Gender effects and synergisms with histocompatibility leukocyte antigens in type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2051-7.
21. Shanger DK, Manzi S, Bontempo F, Nestlerode C, Kamboh MI. Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. *Hum Genet* 2004; 115(5): 393-98.
22. Daniel, W. Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Editorial Limusa-Wiley. 4ta edición. México, 2002:228-55.
23. Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli F, Marchini M et al. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun* 2007;8:138-46.
24. Kong EK, Prokunina-Olsson L, Wong WH, Lau CH, Chan TK et al. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum* 2005;52:1058-62.
25. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 2005; 50(5):264-66.
26. Fortes MP, Gil G, Paredes ME, Gámez LE, Palacios M et al. Allele and haplotype frequencies at human leucocyte antigen class I and II genes in Venezuela's population. *Ann Biol Clin* 2012;70(2):175-81.