



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Associação entre o polimorfismo do gene PDCD1 e a susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico e à artrite reumatoide



Luisa Matos do Canto^{a,1}, Ticiania Della Justina Farias^{a,1}, Mayara Delagnelo Medeiros^a, Cíntia Callegari Coêlho^a, Aline Fernanda Rodrigues Sereia^a, Lia Kubelka Fernandes de Carlos Back^a, Filipe Martins de Mello^b, Adriana Fontes Zimmermann^c, Ivânio Alves Pereira^c e Ilíada Rainha de Souza^{a,*}

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Florianópolis, SC, Brasil

^b Universidade do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Reumatologia, São Paulo, SP, Brasil

^c Universidade Federal de Santa Catarina, Hospital Universitário, Divisão de Reumatologia, Florianópolis, SC, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 4 de julho de 2014

Aceito em 6 de maio de 2015

On-line em 17 de julho de 2015

Palavras-chave:

Artrite reumatoide

Lúpus eritematoso sistêmico

Autoimunidade

Gene PDCD1

Polimorfismo PD1.3

R E S U M O

Objetivo: Este estudo teve como objetivo analisar a relação entre o polimorfismo do gene PDCD1 (*programmed cell death 1*) (PD1.3G/A - rs11568821) com características do lúpus eritematoso sistêmico (LES) e da artrite reumatoide (AR) em uma população do sul do Brasil.

Métodos: A técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi utilizada para analisar amostras de 95 pacientes com LES e 87 com AR, assim como em 128 indivíduos do grupo controle de Santa Catarina, sul do Brasil. Foi analisada a probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e a *odds ratio* (OR), considerando um IC 95% e $p \leq 0,05$.

Resultados: As frequências alélicas PD1.3 A foram de 0,095 (LES), 0,115 (AR) e 0,078 (controles). Os genótipos do grupo controle estavam em EHW, enquanto aqueles dos pacientes com LES e AR não estavam. No entanto, não foi encontrada associação entre o polimorfismo PD1.3 e a susceptibilidade ao LES ou à AR, nem com dados clínicos ou epidemiológicos.

Conclusão: Não foi encontrada associação significativa entre o polimorfismo PD1.3 e a susceptibilidade ao LES ou à AR nessa população do sul do Brasil.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

E-mail: iliadarainha@gmail.com (I.R. Souza).

¹ Os dois primeiros autores contribuíram igualmente neste manuscrito.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2015.05.001>

0482-5004/© 2015 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Association of PD1.3 polymorphism to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis susceptibility

A B S T R A C T

Keywords:

Rheumatoid arthritis
Systemic lupus erythematosus
Autoimmunity
PD1.3 gene
PD1.3 polymorphism

Objective: This study aims to analyze the relationship of programmed cell death 1 (PD1) gene polymorphism (PD1.3G/A - rs11568821) with features of systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) in a Southern Brazilian population.

Methods: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) was performed in 95 SLE and 87 RA patients and 128 control group individuals from Santa Catarina, Southern Brazil. The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) test, and odds ratio (OR) were analyzed, considering CI 95% and $p \leq 0.05$.

Results: The PD1.3 A allele frequencies were 0.095 (SLE), 0.115 (RA) and 0.078 (controls). The genotypes of the control group were in HWE, while those of SLE and RA patients were not. However, we found no association between PD1.3 polymorphism and the SLE or RA susceptibility, nor clinical or epidemiological data.

Conclusion: There was no significant association between PD1.3 polymorphism and SLE or RA susceptibility in this Southern Brazilian population.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

As doenças reumáticas autoimunes compartilham achados clínicos e são causadas por múltiplos fatores, incluindo uma base genética complexa, juntamente com fatores não genéticos, que contribuem em diferentes graus para cada indivíduo afetado.¹ Os polimorfismos genéticos têm sido investigados, revelando novas evidências de contribuição genética para as doenças reumáticas. Entre as doenças autoimunes, o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a artrite reumatoide (AR) têm sido os principais alvos de estudos de variação genética, uma vez que representam transtornos sistêmicos com um amplo espectro de manifestações clínicas.^{1,2}

O LES acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva e sua principal característica é a produção de autoanticorpos contra antígenos nucleares, como DNA de cadeia dupla (dsDNA), ribonucleoproteínas (RNP) e antígeno Smith (Sm); bem como antígenos citoplasmáticos e de superfície celular.³ Esses autoanticorpos se depositam em vários órgãos, causando inflamação e levando a sintomas que podem variar de sutis a potencialmente fatais. Podem ocorrer manifestações sistêmicas, incluindo febre, fadiga e perda de peso, bem como dor nas articulações decorrente da artrite, eritema malar e discoide, fotossensibilidade e envolvimento do sistema nervoso central e periférico, rins, coração e pulmões.¹ A progressão da doença é individual e heterogênea, de modo que têm sido procurados diferentes biomarcadores a fim de desvendar a susceptibilidade e o desenvolvimento da doença, bem como para orientar decisões terapêuticas.^{4,5}

A patogênese da AR é complexa e resulta em inflamação crônica das articulações e, em muitos pacientes, complicações sistêmicas, como nódulos subcutâneos, comprometimento pulmonar e aterosclerose precoce, o que pode ser um desafio no que diz respeito ao tratamento.⁶ A fim de se chegar a um melhor prognóstico e, conseqüentemente, melhores

desfechos clínicos na AR, é necessário identificar marcadores que possibilitem a subcategorização da doença.⁷ Até o momento, fatores serológicos, como o fator reumatoide (FR), os autoanticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPA) e o marcador de inflamação aguda proteína C-reativa (PCR), têm ajudado a classificar fenótipos clínicos da AR.⁸⁻¹¹ O fator reumatoide é um autoanticorpo dirigido contra a porção Fc da IgG e se correlaciona com a gravidade da doença;¹² por sua vez, os ACPA são dirigidos contra proteínas citrulinadas e também podem ajudar a prever uma doença mais grave e erosiva.¹³

Embora a etiologia do LES e da AR não esteja bem estabelecida, hipotetiza-se que a ativação desregulada dos linfócitos desempenhe um papel importante na quebra da tolerância imunológica e leve à autorreatividade.^{2,14} Envolvidas nesses processos, as moléculas coestimuladoras são essenciais para o equilíbrio entre a ativação e a inibição dos linfócitos T.¹⁵ Dentre essas moléculas, a proteína PD-1 tem mostrado um importante envolvimento na profunda perda de autotolerância, o que leva à rápida letalidade associada à infiltração de linfócitos em vários órgãos.¹⁶ Essa proteína é expressa na superfície dos linfócitos T, linfócitos B e células mieloides e é um membro da família CD28 que pertence à superfamília das imunoglobulinas e atua como uma molécula inibitória dos linfócitos T, após interação com os seus ligantes PDL-1 e PDL-2 (*programmed cell death ligand-1* e *2*).¹⁷ Após a ativação inicial das interações com os linfócitos T, o complexo PD-1-PDL-1/2 pode limitar a proliferação dos linfócitos T autorreativos e a produção de citocinas. Por sua vez, a PD-1, estimulada por antígenos, atenua a sinalização dos receptores de linfócitos T (TCR - *T-cell receptor*). A quantidade de expressão de PD-1 e o grau de envolvimento entre essa proteína e seus ligantes regulam o limiar de ativação dos linfócitos T e a quantidade de citocinas produzidas.^{18,19} A deficiência de PD-1 em ratos leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes espontâneas, o que sinaliza uma função essencial de PD-1 nos mecanismos de tolerância.²⁰⁻²³

Tabela 1 – Características dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide (AR) e controles do sul do Brasil

	LES	AR	Controles
Feminino (%)	92 (96,84)	75 (86,21)	123 (96,09)
Idade média (DP)	37,35 (± 12,16)	54,42 (± 13,33)	47,38 (± 15,04)
DP, desvio padrão.			

A proteína PD-1 é codificada pelo gene codificado pelo gene *PDCD1*, localizado no locus 2q37.3. Entre os SNPs encontrados nessa região, o *PD1.3G/A* (rs11568821) representa um polimorfismo potencialmente funcional relacionado com a regulação da transcrição de *PD-1*.²⁴ O alelo *PD1.3A* altera o sítio de ligação do fator de transcrição *RUNX1* (ou *AML1*), localizado na região ativadora do íntron 4, o que poderia levar à expressão aberrante da proteína e sugerir um mecanismo para a quebra da autotolerância. Estudos de associação^{25,26} correlacionaram a presença do alelo *PD1.3A* com o LES em populações mexicanas e escandinavas²⁵ e com o *diabetes mellitus* tipo 1 e AR na Dinamarca e na Suécia, respectivamente.^{26,27} No entanto, algumas populações da Ásia são não polimórficas para essa região genômica e apresentam apenas o alelo *PD1.3G*.²⁸⁻³⁰ Isso enfatiza a diversidade de frequências alélicas entre as populações e apoia a necessidade de estudar a associação desse polimorfismo em outras localidades. No Brasil, três estudos avaliaram as frequências do polimorfismo *PD1.3*. Um deles foi feito em pacientes com pênfigo foliáceo (também uma doença autoimune),³¹ outro foi feito com trabalhadores expostos à sílica³² e o terceiro foi uma coorte de pacientes com doença de Chagas³³ e demonstraram a presença de ambos os alelos nessa população. Assim, por meio deste estudo, pretende-se avaliar a frequência do polimorfismo *PD1.3* em uma população do sul do Brasil e sua relação com a susceptibilidade ao LES e à AR.

Métodos

Participaram deste estudo 95 pacientes com LES, 87 com AR e 128 indivíduos controle, depois de obtido o consentimento informado de todos os pacientes e controles. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (CEP/UFSC - número do processo 172/06). As mulheres representavam 96,84% dos pacientes com LES, 86,10% dos pacientes com AR e 96,09% dos controles. A idade média dos pacientes com LES foi de 37,35 ± 12,16 anos, dos pacientes com AR foi de 54,42 ± 13,33 anos e do grupo controle foi de 47,38 ± 15,04 anos (tabela 1). Os pacientes foram admitidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, Florianópolis, Brasil, de 2007 a 2009, e diagnosticados de acordo com os critérios do American College of Rheumatology de 1987. O grupo controle foi composto por voluntários saudáveis, sem antecedentes pessoais ou familiares de doenças autoimunes. Os dados familiares, epidemiológicos e clínicos dos indivíduos foram obtidos por meio de questionários e prontuários médicos. Com relação aos dados clínicos, avaliaram-se os prontuários médicos dos pacientes com LES à procura de artrite, fotossensibilidade, fenômeno de Raynaud e nefrite, que eram as manifestações clínicas recorrentes nesse

grupo. Nos pacientes com AR, considerou-se a positividade de fator reumatoide (FR) (> 20 UI/mL) e os níveis de proteína C-reativa (PCR) acima do valor de referência (> 5 mg/L) como os dados clínicos a serem associadas com os alelos.

Foram coletadas amostras de sangue dos pacientes com LES e AR e dos indivíduos do grupo controle. Foi extraído DNA com a técnica de fenol-clorofórmio.³⁴ O alelo *PD1.3A* (*PDCD1*) foi detectado por polimorfismo de fragmentos de restrição com a reação em cadeia da polimerase (PCR -RFLP).³⁵ O produto de PCR de 180 pb foi digerido pela endonuclease de restrição *PstI* (BioLabs Inc., Nova Inglaterra), de acordo com as instruções do fabricante. Todos os experimentos foram feitos com controles internos negativos e positivos previamente genotipados no Laboratório de Genética Molecular Humana - UFPR. O produto da digestão foi corado com solução GelRed® e submetido a eletroforese em um gel de agarose a 3%. O DNA foi visualizado com um sistema de fotodocumentação de gel (MiniBISPro DNR). O genótipo foi classificado de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados (GG -180 pb; GA - 180 pb, 150 pb e 30 pb; AA - 150 pb e 30 pb).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi analisado com o teste de χ^2 . As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas pela contagem direta. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os pacientes e controles pelo teste exato de Fisher, com o programa SPSS (versão 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Esse programa também foi usado para calcular a *odds ratio* (OR), a fim de determinar a associação do alelo *PD1.3A* com as doenças estudadas, bem como sua associação com os fatores de mau prognóstico de pacientes com LES e AR. Adotou-se um valor de $p = 0,05$ como o limite de significância para todos os testes.

Resultados

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *PD1.3* encontradas entre os grupos são mostradas na tabela 2. A distribuição dos genótipos no grupo controle estava em EHW ($\chi^2_{(1)} = 2,24$, $p = 0,13$), mas as distribuições observadas nos pacientes com LES e AR não estavam ($\chi^2_{(1)} = 6,60$, $p = 0,01$ para LES e $\chi^2_{(1)} = 9,02$, $p < 0,001$ para AR). No entanto, não foi encontrada associação entre os alelos ou genótipos e as duas doenças ($p > 0,05$) (tabela 2).

Entre os pacientes com LES, 49,5% tinham artrite, 40% queixavam-se de fotossensibilidade, 15,8% experimentavam o fenômeno de Raynaud e 30,5% apresentavam comprometimento renal. Foi analisada a associação entre esses fatores clínicos e os alelos *PD1.3* e genótipos, mas não foram encontrados resultados significativos (tabela 3).

Menos da metade dos pacientes com AR (46,15%) apresentou alto nível de PCR e 66,67% tiveram FR positivo. No entanto, esses fatores não estavam associados à presença do alelo *PD1.3A* em homozigose ou heterozigose (tabela 3).

Discussão

Pela primeira vez no Brasil considerou-se o gene *PDCD1* como um candidato à suscetibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) e à artrite reumatoide (AR). Testaram-se as associações entre o SNP *PD1.3A* e manifestações clínicas e

Tabela 2 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo PD1.3 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide (AR) e controles. Foram calculados os valores do equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) para a distribuição genotípica e a análise da associação entre as doenças e o polimorfismo PD1.3 (G/A) em amostras de pacientes e controles não afetados da população brasileira

	LES n = 95	p	AR n = 87	p	Controles n = 128
Alelo G	0,905	(Ref.)	0,885	(Ref.)	0,922
Alelo A	0,095	0,661	0,115	0,364	0,078
GG	0,842	(Ref.)	0,816	(Ref.)	0,859
GA	0,126	0,940	0,138	0,715	0,125
AA	0,032	0,755	0,046	0,206	0,016
EHW (valor de p)	$\chi^2_{(1)} = 6,60 (0,010)$		$\chi^2_{(1)} = 9,02 (<0,001)$		$\chi^2_{(1)} = 2,24 (0,130)$

χ^2 (valor de qui-quadrado), $p \leq 0,05$ não foi considerado em EHW.

laboratoriais. Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos.

Uma vez que as frequências genotípicas dos pacientes com LES e AR não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 3) e divergiram do grupo controle, foi investigada uma associação putativa com essas doenças. O frequência do genótipo AA foi muito baixa em todos os grupos (0,032 no grupo de pacientes com LES, 0,046 no de AR e 0,016 nos controles), como mostrado por outros estudos caso-controle em diferentes populações, em que as frequências AA foram todas abaixo de 0,05.^{31,33,35-44} No entanto, uma coorte iraniana mostrou frequências genotípicas AA de 0,20 nos controles e 0,44 em pacientes com câncer colorretal (CCR) e revelou, assim, uma associação entre esse genótipo e o CCR ($p = 0,0005$).⁴⁵ No Brasil, a frequência do genótipo AA também foi baixa em três coortes diferentes, em que foram estudados pacientes com doença de Chagas (0,03 e 0,01 nos controles), pênfigo foliáceo³³ (0,007 e 0,01 nos controles)³¹ e chegaram a 0% em um grupo de trabalhadores expostos à sílica (0,03 nos controles).³² Curiosamente, algumas populações carregam o alelo menor, mas não foi encontrada descrição de homozigose. Foram encontrados apenas indivíduos GG e AG. No entanto, em nosso estudo, os genótipos analisados não apresentaram valor de OR com diferença estatisticamente significativa quando considerado o risco de desenvolvimento de LES ou AR.^{35,46-48}

As associações do alelo PD1.3A com o desenvolvimento de doenças têm sido cada vez mais investigadas, não só nos

pacientes com LES e AR,^{25,26,28,29,35-37,46,49-55} mas também em outras doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, como o diabetes mellitus tipo I (DM1),^{27,38,42} a doença de Graves e Addison,³⁹ a espondilite anquilosante⁴⁴ e a miastenia gravis,⁴¹ bem como em outras condições como CCR⁴⁵ e trabalhadores expostos à sílica (tabela 4).³² A frequência do alelo PD1.3A difere amplamente entre as populações em todo o mundo. Três estudos chineses que estudaram a relação entre a AR e a síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada não encontraram variação alélica na população analisada.^{28,30,55} Isso também foi observado no Japão, em um estudo semelhante.²⁹ Estudos europeus mostraram a presença do polimorfismo PD1.3, embora a associação com doenças varie entre os estudos. Uma associação do PD1.3A com o LES foi demonstrada por Prokunina et al.^{25,26} em mulheres europeias e mexicanas e por Ferreiros-Vidal et al.⁵¹ em pacientes com LES da Alemanha, República Checa e Hungria. No entanto, Ferreiros-Vidal et al. mostraram previamente uma reversão de padrões em uma coorte espanhola, com diminuição do risco de desenvolvimento de LES em portadores do PD1.3A.⁵⁰ Pacientes com AR também foram genotipados para o polimorfismo rs11568821 no gene PDCD1 por alguns grupos^{28,29,36,55} e, como mencionado anteriormente, coortes chinesas e japonesas apresentavam apenas o alelo PD1.3G. Um estudo sueco foi o único a apresentar dados sobre a AR e o polimorfismo rs11568821 no gene PDCD1, mas não foi demonstrada associação entre a doença e o alelo ou genótipos.³⁶ No entanto,

Tabela 3 – Características clínicas presentes nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide (AR), e sua associação com o polimorfismo PD1.3

	Pacientes com LES n (%)	Valor de p associado		
		Alelo (A)	AA	AA + AG
Artrite	47 (49,5)	0,963	0,553	0,752
Fotossensibilidade	38 (40)	0,312	0,361	0,294
Fenômeno de Reynaud	14 (15,8)	0,570	0,827	0,777
Transtorno renal	29 (30,5)	0,786	0,440	0,388
	Pacientes com AR n (%)	Valor de p associado		
		Alelo (A)	AA	AA + AG
FR	50 (66,67)	0,122	0,291	0,302
PCR	36 (46,15)	0,910	0,874	0,965

FR, fator reumatoide; PCR, proteína C-reativa.

Tabela 4 – Frequências alélicas de PD1.3A (rs11568821) encontradas por diferentes estudos

População	Doença estudada	Frequências PD1.3A %		OR (IC 95%)	Estudo
		Controles	Pacientes		
Sueca	LES	8	11,0	1,44 (0,93-2,23)	Prokunina et al. 2002
Mexicana	LES	2,0	7	3,23 (1,46-7,16) ^b	Prokunina et al. 2002
Dinamarquesa	DM1	6,8	12,2	1,92 (1,1-3,3) ^b	Nielsen et al. 2003
Espanhola	LES	12,9	9,4	0,70 (0,54-0,90) ^b	Ferreiros-Vidal et al. 2004
Dinamarquesa	LES	6,8	11,6	1,80 (0,96-3,4)	Nielsen et al. 2004
Europeia (mulheres)	LES	7	11,0	1,60 (1,17-2,18) ^b	Prokunina et al. 2004a
Sueca	AR	7,3	8,5	1,18 (0,99-1,4)	Prokunina et al. 2004b
Afro-americana (mulheres)	LES	10,0	5	2,19 (0,54-8,85)	Sanghera et al. 2004
Americana de origem europeia (mulheres)	LES	11,0	13,0	1,23 (0,87-1,73)	Sanghera et al. 2004
Norte da Suécia	LES	5,6	7,3	1,35 (0,90-2,02)	Johansson et al. 2005
Chinesa de Hong Kong	AR	0	0	N/D	Kong et al. 2005
Finlandesa	LES	6	3,0	0,50 (0,20-1,26)	Sigurdsson et al. 2005
Sueca	LES	9	9	1,00 (0,68-1,45)	Sigurdsson et al. 2005
Mato Grosso do Sul – Brasil	Pênfigo foliáceo	9,6	5,8	0,58 (0,33-1,03)	Braun-Prado & Petzel-Erler 2007
CEU ^a	LES	8,1	17,1	2,35 (1,1-4,9) ^b	Ferreiros-Vidal et al. 2007
Italiana ^a	LES	10,7	18,7	1,92 (0,9-3,9)	Ferreiros-Vidal et al. 2007
Grega	LES	10,6	12,7	1,22 (0,8-1,8)	Ferreiros-Vidal et al. 2007
Japonesa	AR	0	0	N/D	Iwamoto et al. 2007
Britânica	Doença de Graves	88,4	89,7	1,13 (0,85-1,50)	Sutherland et al. 2007
Norte-americana	LES	4,7	7,2	1,59 (0,78-3,23)	Thorburn et al. 2007
Mexicana	LES de início na infância	2,0	5,2	2,73 (1,35-5,56)	Velázquez-Cruz et al. 2007
Norte-americana	Cirrose biliar primária	11,7	12,5	1,08 (0,74-1,57)	Juran et al. 2008
Sueca	MGH autoimune	8,5	10,8	1,32 (0,74-2,35)	Sakthivel et al. 2008
Francesa	Infecção por CMV depois de transplante de rim	12,9	12,8	1,38 (0,90-2,11)	Hoffmann et al. 2009
Chinesa (Han)	Síndrome de Vogt Koyanagi-Harada	0	0	N/D	Meng et al. 2009
Caucasiana polonesa	DM1	12,9	13,5	1,05 (0,71-1,55)	Fichna et al. 2010
Iraniana	Espondilite anquilosante	11,2	9,3	0,81 (0,48-1,34)	Soleimanifar et al. 2010
Mexicana	Hipersensibilidade Pneumonite	3,8	6,1	1,65 (0,59-4,75)	Zúñiga et al. 2010
Caucasiana polonesa	Urticária crônica	10,0	10,0	0,97 (0,51-1,86)	Brzoza, et al. 2012
Brasileira	Trabalhadores expostos à sílica	13,3	4,3	0,29 (0,10 - 0,88) ^b	Rocha et al. 2012
Afro-americana	LES	2,0	2,6	1,31 (0,94-1,81)	Sanchez et al. 2012
Brasileira	Doença de Chagas	10,0	9	0,90 (0,61-1,33)	Dias et al. 2013
Alemã	Receptores de transplante de fígado	12,5	10,0	0,78 (0,46-1,33)	Thude et al. 2013
Iraniana	Câncer colorretal	40,5	60,6	2,27 (1,50-3,44) ^b	Yousefi et al. 2013
Chinesa (Han)	AR	0	0	N/D	Liu et al. 2014

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; LES, lúpus eritematoso sistêmico; AR, artrite reumatoide; DM1, diabetes tipo 1; ND, não disponível; MGH, miastenia gravis humana.

^a Coleção de amostras europeias coletadas na Alemanha, República Checa e Hungria foram agrupadas como CEU; amostras de Milão, Roma e Nápoles foram agrupadas como Itália; amostras da Grécia foram apresentadas isoladamente (tal como apresentado por Ferreiros-Vidal et al.⁵¹).

^b $p \leq 0,05$ estatisticamente significativos.

o mesmo grupo mostrou uma associação entre o PD1.3A e pacientes com AR com FR negativo. No presente estudo, não foi possível encontrar qualquer associação entre a presença de FR ou altos níveis de PCR e os alelos ou genótipos investigados.

Os pacientes com LES foram também indagados quanto a manifestações clínicas como artrite, fotossensibilidade, fenômeno de Raynaud e envolvimento renal. No entanto, não foi encontrada associação entre os alelos PD1.3 ou genótipos e essas manifestações. Thorburn et al.⁵³ avaliaram o papel de quatro SNPs do PDCD1 (PD1.1A, PD1.3A, PD1.5T e PD1.6A) e

a nefrite, artrite, anticorpo antifosfolípide (APA) do LES e a positividade para DNA de cadeia dupla e não encontraram associação entre o alelo PD1.3A e seu haplótipo associado e qualquer fenótipo clínico. A ocorrência de APA em pacientes com LES também foi analisada por Sanghera et al.³⁵ e revelou uma proteção dos portadores de PD1.3A contra o APA tanto no LES (OR=0,57; IC 95%: 0,32-1,01) quanto nos controles (OR=0,40; IC 95%: 0,19-0,82). Prokunina et al.,²⁶ Johansson et al.³⁷ e Nielsen et al.⁴⁹ avaliaram as manifestações renais em pacientes com LES. O primeiro e o segundo estudos mostraram

uma associação entre o alelo PD1.3 A e os transtornos renais em pacientes com LES da Suécia (OR=2,6; IC 95%: 1,4-4,8, e OR=2,62; IC 95%: 1,28-5,35, respectivamente); o terceiro não encontrou associação entre a nefropatia lúpica e o alelo menor do PD1.3. Quanto à AR, nem o FR nem a PCR estiveram associados à presença do alelo PD1.3 A em homozigose ou heterozigose, ao contrário do que foi encontrado por Prokunina et al.²⁶

Embora estudos mostrem a associação entre o polimorfismo PD1.3 G/A e a AR, LES e outras doenças autoimunes e suas manifestações clínicas, nosso estudo não encontrou diferenças em portadores de alelos menores entre pacientes com AR e LES e controles nem manifestações das doenças.

Financiamento

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Apoio à Pesquisa Científica do Estado de Santa Catarina (Fapesc).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer especialmente aos pacientes pela sua cooperação e paciência e a todos os colegas que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho. Agradecemos também à gentileza da Profa. Dra. Maria Luiza Petzel-Erler, chefe do Laboratório de Genética Molecular Humana - UFPR, por compartilhar seus controles de genótipos.

REFERÊNCIAS

- Goldblatt F, O'Neill SG. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. *Lancet*. 2013;382:797-808.
- Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet*. 2013;382:819-31.
- Grammatikos AP, Tsokos GC. Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. *Trends Mol Med*. 2012;18:101-8.
- Ahearn JM, Liu C-C, Kao AH, Manzi S. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Transl Res*. Mosby, Inc. 2012;159:326-42.
- Murphy G, Lisnevskaia L, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases: challenges to treatment. *Lancet*. 2013;382:809-18.
- Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2009;373:659-72.
- Bax M, van Heemst J, Huizinga TWJ, Toes REM. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*. 2011;63:459-66.
- da Mota LMH, dos Santos Neto LL, Burlingame R, Ménard Ha, Laurindo IMM. Laboratory characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50:375-88.
- Rhodes B, Fürnrohr BG, Vyse TJ. C-reactive protein in rheumatology: biology and genetics. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group. 2011;7:282-9.
- Nielsen S, Bojesen S. Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study. *BMJ Br Med J*. 2012;5244:1-9.
- Goldman K, Gertel S, Amital H. Anti-citrullinated peptide antibodies is more than an accurate tool for diagnosis of rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J*. 2013;15:516-9.
- Habash-Bseiso DE, Yale SH, Glurich I, Goldberg JW. Serologic testing in connective tissue diseases. *Clin Med Res*. 2005;3:190-3.
- van Gaalen Fa, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong Ba, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum*. 2004;50:709-15.
- de Souza AWS, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Cruvinel Wde M, Andrade LEC, et al. Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50:665-79.
- Thangavelu G, Smolarchuk C, Anderson CC. Co-inhibitory molecules: Controlling the effectors or controlling the controllers? *Self Nonself*. 2010;1:77-88.
- Thangavelu G, Parkman JC, Ewen CL, Uwiera RRE, Baldwin TA, Anderson CC. Programmed death-1 is required for systemic self-tolerance in newly generated T cells during the establishment of immune homeostasis. *J Autoimmun*. 2011;36:301-12.
- Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Mäurer M, et al. PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2005;58:50-7.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8:239-45.
- Wei F, Zhong S, Ma Z, Kong H, Medvec A, Ahmed R, et al. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E2480-9.
- Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol*. 1998;10:1563-72.
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11:141-51.
- Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol*. 2001;22:265-8.
- Zhang J, Braun MY. PD-1 deletion restores susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in miR-155-deficient mice. *Int Immunol*. 2014;28:1-9.
- Bertsias GK, Nakou M, Choulaki C, Raptopoulou A, Papadimitraki E, Goulielmos G, et al. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009;60:207-18.
- Prokunina L, Castillejo-López 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.
- Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Seligman VA, Olson JL, et al. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3 A in lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:327-8.
- 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 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 2003;62:492-7.

28. Kong EK-P, Prokunina-Olsson L, Wong WH-S, Lau C-S, Chan T-M, Alarcón-Riquelme M, et al. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1058-62.
29. Iwamoto T, Ikari K, Inoue E, Toyama Y, Hara M, Yamanaka H, et al. Failure to confirm association between PDCD1 polymorphisms and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *J Hum Genet.* 2007;52:557-60.
30. Meng Q, Liu X, Yang P, Hou S, Du L, Zhou H, et al. PDCD1 gene may protect against extraocular manifestations in Chinese Han patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Mol Vis.* 2009;15:386-92.
31. Braun-Prado K, Petzl-Erler ML. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (*fogo selvagem*) disease susceptibility. 2007;321:314-21.
32. Rocha MC, Santos LMB, Bagatin E, Cohen Tervaert JW, Damoiseaux JGMC, Lido AV, et al. Genetic polymorphisms and surface expression of CTLA-4 and PD-1 on T cells of silica-exposed workers. *Int J Hyg Environ Health.* Elsevier GmbH; 2012;215:562-9.
33. Dias FC, Medina TDS, Mendes-Junior CT, Dantas RO, Pissetti CW, Rodrigues Junior V, et al. Polymorphic sites at the immunoregulatory CTLA-4 gene are associated with chronic Chagas disease and its clinical manifestations. *PLoS One.* 2013;8:e78367.
34. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
35. Sanghera 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;115:393-8.
36. 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 and the shared epitope. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1770-3.
37. Johansson M, Arlestig L, Möller B, Rantapää-Dahlqvist S. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1665-9.
38. Cooper JD, Smyth DJ, Bailey R, Payne F, Downes K, Godfrey LM, et al. The candidate genes *TAF5L*, *TCF7*, *PDCD1*, *IL6* and *ICAM1* cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. *BMC Med Genet.* 2007;8:71.
39. Sutherland A, Davies J, Owen CJ, Vaikkakara S, Walker C, Cheetham TD, et al. Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (*IFIH1*) locus contributes to graves' disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3338-41.
40. Juran BD, Atkinson EJ, Schlicht EM, Fridley BL, Petersen GM, Lazaridis KN. Interacting alleles of the coinhibitory immunoreceptor genes cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and programmed cell-death 1 influence risk and features of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2008;47:563-70.
41. Sakthivel P, Ramanujam R, Wang XB, Pirskanen R, Lefvert AK. Programmed Death-1: from gene to protein in autoimmune human myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2008;193:149-55.
42. Hoffmann TW, Halimi J-M, Büchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, Al-Najjar A, et al. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet.* 2010;47:54-8.
43. Fichna M, Zurawek M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Fichna P, Nowak J. PTPN22, PDCD1 and CYP27B1 polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Polish patients. *Int J Immunogenet.* 2010;37:367-72.
44. Soleimanifar N, Amirzargar AA, Mahmoudi M, Pourfathollah AA, Azizi E, Jamshidi AR, et al. Study of programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphisms in Iranian patients with ankylosing spondylitis. *Inflammation.* 2011;34:707-12.
45. Yousefi A, Karimi M. PD-1 gene polymorphisms in Iranian patients with colorectal cancer. *Lab Medicine.* 2013;44:241-4.
46. 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 Hum Genet.* 2007;15:336-41.
47. Zúñiga J, Torres-García D, Jimenez L, Ramírez-Martínez G, Juárez-Nicolás F, Mujica F, et al. PDCD1 gene polymorphisms in different Mexican ethnic groups and their role in the susceptibility to hypersensitivity pneumonitis. *Clin Biochem.* Elsevier B.V. 2010;43:929-31.
48. Brzoza Z, Grzeszczak W, Trautsolt W, Moczulski D. Lack of association of programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphisms with susceptibility to chronic urticaria in patients with positive autologous serum skin test. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22:432-6.
49. Nielsen C, Laustrop H, Voss A, Junker P, Husby S, Lillevang ST. A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2004;13:510-6.
50. Ferreira-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzalez-Escribano F, et al. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2590-7.
51. Ferreira-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli FN, Marchini M, Scorza R, 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.
52. Sigurdsson S, Nordmark G, Göring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.* 2005;76:528-37.
53. Thorburn C, Prokunina-Olsson L. Association of PDCD1 genetic variation with risk and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort. *Genes.* 2007;8:279-87.
54. Sánchez E, Comeau ME, Freedman BI, Kelly Ja, Kaufman KM, Langefeld CD, et al. Identification of novel genetic susceptibility loci in African American lupus patients in a candidate gene association study. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3493-501.
55. Liu C, Jiang J, Gao L, Hu X, Wang F, Shen Y, et al. A promoter region polymorphism in PDCD-1 gene is associated with risk of rheumatoid arthritis in the han Chinese population of southeastern China. *Int J Genomics.* 2014;2014:247637.