









INVESTIGAÇÃO

As variantes do gene CTLA4 + 49AG (rs231775) e CT60 (rs3087243) não estão associadas à alopecia areata em população mexicana de Monterrey, México☆☆☆



Mauricio Andrés Salinas-Santander ^{a,*}, Cristina Susana Cantu-Salinas ^b, Jorge Ocampo-Candiani ^b, Victor de Jesus Suarez-Valencia ^a, Jennifer Guadalupe Ramirez-Guerrero ^a e Celia Nohemi Sanchez-Dominguez ^c

^a Departamento de Investigación, Facultad de Medicina da Universidade de Saltillo, Universidade Autônoma de Coahuila, Saltillo, México

^b Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário Dr. José Eleuterio González, Universidade Autônoma de Nuevo León, Monterrey, México

^c Departamento de Bioquímica e Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidade Autônoma de Nuevo León, Nuevo León, México

Recebido em 6 de junho de 2019; aceito em 24 de setembro de 2019

Disponível na Internet em 12 de maio de 2020

PALAVRAS-CHAVE

Alopecia areata;
Doenças autoimunes;
Nucleotídeo único;
Polimorfismo

Resumo

Fundamentos: Alopecia areata é doença autoimune que causa perda de cabelo sem cicatrizes na lesão. As variantes genéticas do gene do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA4), um regulador negativo da resposta das células T, foram associadas a predisposição a doenças autoimunes em diferentes populações; no entanto, o envolvimento dessas variantes genéticas no desenvolvimento da alopecia areata é controverso.

Objetivo: Avaliar a associação potencial de duas variantes do gene CTLA4 e alopecia areata em uma população mexicana.

Métodos: Foram genotipadas por PCR-RFLP as variantes + 49AG (rs231775) e CT60 (rs3087243) de 50 pacientes com alopecia areata e 100 controles saudáveis.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.03.001>

☆ Como citar este artigo: Salinas-Santander MA, Cantu-Salinas CS, Ocampo-Candiani J, Suarez-Valencia VJ, Ramirez-Guerrero JG, Sanchez-Dominguez CN. CTLA4 + 49AG (rs231775) and CT60 (rs3087243) gene variants are not associated with alopecia areata in a Mexican population from Monterrey Mexico. An Bras Dermatol. 2020;95:283–8

☆☆ Trabalho realizado no Departamento de Investigación, Facultad de Medicina da Universidade de Saltillo, Universidade Autônoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México e Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário Dr. José Eleuterio González, Facultad de Medicina, Universidade Autônoma de Nuevo León, Nuevo León, México.

* Autor para correspondência.

E-mail: msalinsa@yahoo.com (M.A. Salinas-Santander).

Resultados: Não foi observada diferença estatística para alguma das variantes genéticas quanto às frequências alélicas ou genotípicas entre os pacientes com alopecia areata e controles quando considerados os parâmetros de história familiar/pessoal de doenças autoimunes ou sexo ($p > 0,05$).

Limitações do estudo: Amostra pequena de pacientes e coleta de dados em apenas uma população do nordeste do México.

Conclusão: As variantes genéticas rs231775 e rs3087243 do gene CTLA4 não são um fator de risco para o desenvolvimento de alopecia areata na população mexicana analisada.

© 2020 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A alopecia areata (AA) é doença autoimune que causa perda de cabelo sem cicatrizes na lesão e ocorre em qualquer idade.¹ Ela normalmente se apresenta como áreas arredondadas de alopecia, únicas ou múltiplas, embora possa ocorrer calvície completa (AA total). AA universal é definida como a perda de pelos em todo o corpo. A AA também pode se apresentar na circunferência da cabeça, chamada AA ofiásica.² A AA é considerada doença poligênica influenciada por herança geneticamente complexa, especialmente de genes relacionados a doenças autoimunes e inflamatórias, além de fatores ambientais.^{3,4} A literatura relata que vários genes do sistema imunológico contribuem para o desenvolvimento dessa doença, como o gene regulador autoimune (AIRE), antígeno leucocitário humano (HLA), genes de interleucina (IL), antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA4), proteína tirosina fosfatase não receptora 22 (PTPN22), fator de necrose tumoral da superfamília 6 ou CD95 (FAS) e ligante FAS (FASL), entre outros.^{5,6}

O CTLA4 (2q34) é membro da superfamília imunoglobulinas que codificam uma proteína que é potente reguladora negativa da resposta das células T. Por seu papel na manutenção da tolerância imunológica, ele tem sido apontado como um gene de suscetibilidade em doenças autoimunes humanas, e apresenta vários polimorfismos associados ao seu desenvolvimento.⁷ Entre os polimorfismos, duas variantes genéticas podem contribuir para a suscetibilidade ao AA: +49AG (rs231775), uma variação *missense* que leva a uma substituição do aminoácido treonina por alanina no códon 17 no peptídeo líder (T17A) e CT60 (rs3087243), localizada em 236 bp *downstream* no gene CTLA4 (3'-UTR).⁸ No entanto, estudos recentes feitos em diferentes populações indicam que a relação dessas variantes genéticas no desenvolvimento de AA é controversa.^{3,9}

O presente estudo teve como objetivo determinar se as variantes dos genes CTLA4+49AG (rs231775) e CT60 (rs3087243) constituem um fator de predisposição para AA em uma coorte de pacientes mexicanos.

Material e métodos

Seleção de pacientes e controles

O estudo incluiu 50 indivíduos mexicanos com diagnóstico de AA não relacionados entre si (32 mulheres e 18 homens; idade média: 30 ± 15 anos) e 100 participantes saudáveis (59 mulheres e 41 homens; idade média: 25 ± 8 anos);

os controles apresentavam história familiar médica negativa para doenças autoimunes/inflamatórias. Os pacientes foram recrutados no Departamento de Dermatologia após a aceitação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e registrado sob o código DE09-001. Detalhes adicionais sobre as características clínicas e demográficas, tipo de AA e distribuição de cada paciente foram obtidos durante a avaliação clínica.

Isolamento e genotipagem de DNA

O DNA genômico foi isolado do sangue venoso periférico com o método *salting out* e suspenso em Tris-EDTA (pH 7,8) a uma concentração final de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ antes do uso. As frequências genotípicas e alélicas das variantes do gene CTLA4+49AG (rs231775) e CT60 (rs3087243) foram caracterizadas por PCR-RFLP com um termociclador MJ Mini PTC1148 (Bio-Rad, Hercules; CA, Estados Unidos), *primers* oligonucleotídicos específicos (IDT, Coralville, IA, Estados Unidos) e enzimas de restrição (New England Biolabs, Ipswich, MA, Estados Unidos) de acordo com um protocolo publicado anteriormente.¹⁰ Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% com brometo de etídio, observados no transiluminador UVP modelo ZUV de alto desempenho (Upland, CA, E) e documentados.

Análise estatística

Para análise genética, o tamanho da amostra foi calculado com base na incidência mundial de AA de 2%,¹¹ assumiu-se um poder de 99,0% (um valor-Z de 2,33), foi obtido o número mínimo de 43 indivíduos.

O *software* SPSS v21.0 para Windows (SPSS, Inc. Chicago, IL, Estados Unidos) e o programa estatístico Epi-INFO™ 7 (Stone. Mountain, GA, USD Inc) foram usados para análise dos dados. O equilíbrio de Hardy-Weinberg para os alelos foi obtido por meio de um teste de qualidade de ajuste e a dependência genotípica entre pacientes e controles foi determinada com um teste de χ^2 . A razão de probabilidades (OR) foi calculada a partir de tabelas de contingência 2×2 ($p < 0,05$).

Tabela 1 Testes para desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em pacientes com AA e controles saudáveis

Teste SNP/EHW	Casos de AA (valor-p)	Controles (valor-p)
<i>rs231775</i>		
Pearson	0,81	0,88
Razão de verossimilhança	0,81	0,88
Fisher exato	0,78	1,00
<i>rs3087243</i>		
Pearson	0,89	0,50
Razão de verossimilhança	0,89	0,50
Fisher exato	1,00	0,54

Resultados

Características clínicas dos participantes

O presente estudo analisou a distribuição do genótipo e a frequência alélica das variantes do gene CTLA4 +49AG e CT60. O universo do estudo (n) consistiu em 50 pacientes com AA e 100 controles. A apresentação clínica da AA nos pacientes foi: 41 pacientes com AA em placas (unifocal n = 14, oito mulheres e seis homens; multifocal n = 27, 19 mulheres e 8 homens), quatro pacientes com AA ofiásica (três mulheres e um homem), uma mulher com AA total e quatro pacientes com AA universal (três homens e um mulher). Dez pacientes (20%) tinham histórico pessoal de doenças autoimunes (vitiligo, diabetes melito tipo 2, entre outros) e 36 indivíduos (72%) tinham histórico familiar de doença imunológica.

Análise de alelos e genótipos

Vários testes foram feitos para ambas as variantes genéticas, a fim de avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW; [tabela 1](#)), todos com $p > 0,05$, indicaram que as variantes dos genes rs231775 e rs3087243 estavam em EHW nos pacientes com AA e controles.

Os alelos e genótipos do CTLA4 rs231775 e do rs3087243 do grupo controle foram comparados com os dos indivíduos com AA (todos os tipos de AA) e com os diferentes tipos de AA; a [tabela 1](#) apresenta os resultados dessa comparação. Para CTLA4 rs231775, 30% dos pacientes com AA apresentaram genótipo AA do tipo selvagem homocigótico, 48% apresentaram o genótipo AG heterocigótico e os 22% restantes, genótipo GG variante homocigótica. Para CTLA4 rs3087243, 44% dos pacientes com AA apresentaram o genótipo GG do tipo selvagem homocigótico, 44% apresentaram o genótipo AG heterocigótico e os 12% restantes, AA variante homocigótica.

Associação dos genótipos em pacientes com alopecia areata

Quando os genótipos e frequências de alelos CTLA4 rs231775 e rs3087243 foram comparados entre toda a coorte (todos os tipos de AA) e controles, observou-se que o genótipo AG heterocigótico para CTLA4 rs231775 e rs3087243 era mais

frequente nos controles do que em todos os grupos de pacientes com AA. Além disso, não se observou associação entre variantes alélicas e AA nos pacientes analisados ($p > 0,05$; [tabela 2](#)). Além disso, não foi encontrada relação entre o genótipo e o tipo de AA com a história pessoal/familiar de doenças autoimunes ou o sexo dos pacientes analisados ($p > 0,05$; [tabela 3](#)).

Discussão

AA é doença autoimune com perda de cabelos que tem sido associada a múltiplas variantes genéticas, várias das quais participam de vias de resposta imune relacionadas ao HLA.¹² O produto do gene CTLA4 é um receptor expresso pelas células T CD4+ e CD8+. Experimentos em camundongos *knockout* demonstraram o importante papel que o CTLA4 desempenha na proteção contra a autoimunidade. O CTLA-4 é um regulador negativo crítico das respostas das células T e sua ação nas células Treg pode controlar a atividade de outras células e a autoimunidade fatal.¹³

Foi sugerida a associação entre a presença das variantes do gene CTLA4 e o desenvolvimento de diferentes doenças autoimunes.^{14,15} No entanto, nas doenças imunológicas dermatológicas, os resultados são controversos; no vitiligo, a literatura relata tanto sua participação como não influência.¹⁶ Uma situação semelhante foi observada no desenvolvimento da psoríase.^{17,18}

Nesse sentido, considerando a possível contribuição da função autoimune na alopecia, estudos de variantes genéticas do gene CTLA4 foram conduzidos em diversas populações. Uma análise anterior dessa associação sugeriu o possível envolvimento das variantes do gene CTLA4 como fator de risco no desenvolvimento de AA em uma população europeia,⁸ com efeito mais forte em pacientes com formas acentuadas da doença.

Outro estudo feito em uma população italiana, no qual foram analisadas as variantes dos genes rs231775 e rs3087243, apontou esse último como fator de risco no desenvolvimento de AA em placas.⁹ Por outro lado, estudo feito no Irã não conseguiu provar a associação da variante do gene rs3087243 no desenvolvimento de AA.³

Em estudo anterior, os autores observaram a participação de variantes genéticas de TNF α e PTPN22¹⁹ como fator de risco para AA em pacientes mexicanos; a função de ambos os genes está relacionada à regulação dos mecanismos imunológicos. No entanto, a participação das variantes genéticas do CTLA4 na AA não foi analisada nessa população.

Alguns SNPs dentro do gene CTLA-4 já foram analisados quanto à suscetibilidade à artrite reumatoide (AR) na população mexicana; entre eles, rs5742909, rs231775 e rs3087243; sugere-se que o haplótipo -319C/+49G/CT60G do gene CTLA-4 é fator de risco para AR, enquanto que o SNP rs3087243 pode ser fator protetor contra esse tipo de doença autoimune.²⁰

No entanto, não foram observadas diferenças significativas para rs231775 e rs3087243 no presente estudo ([tabela 2](#)), sugeriu-se que essas variantes não são fator de risco no desenvolvimento de AA ou de AA em placas na população mexicana.

Tabela 2 Frequência de alelos e genótipo das variantes genéticas CTLA4 + 49AG (rs231775) e CT60 (rs3087243) em pacientes com AA e controles saudáveis

Genótipo	Pacientes com AA n (%)	Controles n (%)	χ^2	OR	IC 95%	valor-p
<i>Todos os tipos de AA</i>						
	rs231775					
AA	15 (30)	28 (28,3)	0,086			0,958
AG	24 (48)	50 (50,5)				
GG	11 (22)	21 (21,2)				
AG + GG	24 (48) + 11 (22)	50 (50,5) + 21 (21,2)	0,048	1,087	0,515-2,292	0,827
<i>Alelos</i>						
A	54 (54)	106 (53,5)	0,006	1,019	0,629-1,650	0,939
G	46 (46)	92 (46,5)	0,006	0,982	0,606-1,590	0,939
<i>AA em placas</i>						
AA	13 (31,7)	28 (28,3)	0,225			0,893
AG	19 (46,3)	50 (50,5)				
GG	9 (22)	21 (21,2)				
AG + GG	19 (46,3) + 9 (22)	50 (50,5) + 21 (21,2)	0,164	1,177	0,534-2,594	0,685
<i>Alelos</i>						
A	45 (54,9)	106 (53,5)	0,042	1,056	0,630-1,770	0,837
G	37 (45,1)	92 (46,5)	0,042	0,947	0,565-1,589	0,837
<i>AA multifocal</i>						
AA	11 (40,7)	28 (28,3)	1,66			0,436
AG	12 (44,5)	50 (50,5)				
GG	4 (14,8)	21 (21,2)				
AG + GG	12 (44,5) + 4 (14,8)	50 (50,5) + 21 (21,2)	1,541	1,743	0,721-4,218	0,215
<i>Alelos</i>						
A	34 (63)	106 (53,5)	1,527	1,476	0,795-2,740	0,217
G	20 (37)	92 (46,5)	1,527	0,678	0,365-1,259	0,217
<i>Todos os tipos de AA</i>						
	rs3087243					
AA	6 (12)	16 (16)	2,129			0,345
AG	22 (44)	52 (52)				
GG	22 (44)	32 (32)				
AG + GG	22 (44) + 22 (44)	52 (52) + 32 (32)	0,426	0,716	0,262-1,959	0,514
<i>Alelos</i>						
A	34 (34)	84 (42)	1,788	0,711	0,432-1,173	0,181
G	66 (66)	116 (58)	1,788	1,406	0,853-2,318	0,181
<i>AA em placas</i>						
AA	6 (14,6)	16 (16)	1,168			0,558
AG	18 (43,9)	52 (52)				
GG	17 (41,5)	32 (32)				
AG + GG	18 (43,9) + 17 (41,5)	52 (52) + 32 (32)	0,041	0,9	0,325-2,49	0,839
<i>Alelos</i>						
A	30 (36,6)	84 (42)	0,708	0,797	0,469-1,353	0,4
G	52 (63,4)	116 (58)	0,708	1,255	0,739-2,132	0,4
<i>AA multifocal</i>						
AA	4 (14,8)	16 (16)	0,031			0,985
AG	14 (51,9)	52 (52)				
GG	9 (33,3)	32 (32)				
AG + GG	14 (51,9) + 9 (33,3)	52 (52) + 32 (32)	0,023	0,913	0,278-2,998	0,881
<i>Alelos</i>						
A	22 (40,7)	84 (42)	0,028	0,949	0,515-1,749	0,868
G	32 (59,3)	116 (58)	0,028	1,053	0,572-1,941	0,868

Tabela 3 Análise das variantes genéticas CTLA4 + 49AG (rs231775) e CT60 (rs3087243) por sexo e história pessoal/familiar de doenças autoimunes

	AA	AG	GG	p	AA	AG	GG	p
Sexo								
Feminino (%)	8 (25%)	16 (50%)	8 (25%)	0,555	4 (12,5%)	14 (43,75%)	14 (43,75%)	0,990
Masculino (%)	7 (38,9%)	8 (44,4%)	3 (16,7%)		2 (11,2%)	8 (44,4%)	8 (44,4%)	
História pessoal de doenças autoimunes								
Sim (%)	3 (30%)	3 (30%)	4 (40%)	0,261	1 (10%)	3 (30%)	6 (60%)	0,515
Não (%)	12 (30%)	21 (52,5%)	7 (17,5%)		5 (12,5%)	19 (47,5%)	16 (40%)	
História familiar de doenças autoimunes								
Sim (%)	10 (27,8%)	19 (52,8%)	7 (19,4%)	0,548	4 (11,1%)	17 (47,2%)	15 (41,7%)	0,761
Não (%)	5 (38,4%)	4 (30,8%)	4 (30,8%)		2 (14,3%)	5 (35,7%)	7 (50%)	

Conclusão

As variantes genéticas rs231775 e rs3087243 do gene CTLA4 não constituem fator de risco no desenvolvimento de AA na população mexicana de Monterrey, México. Além disso, essas variantes genéticas não apresentam associação com antecedentes familiares/pessoais de doenças autoimunes ou com o gênero dos sujeitos do estudo.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Mauricio Andrés Salinas Santander: Análise estatística; aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Cristina Susana Cantu-Salinas: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Jorge Ocampo-Candiani: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; participação efetiva na orientação da pesquisa; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Victor de Jesus Suarez-Valencia: Aprovação da versão final do manuscrito; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Jennifer Guadalupe Ramirez-Guerrero: Aprovação da versão final do manuscrito; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; revisão crítica da literatura.

Celia Nohemi Sanchez-Dominguez: Aprovação da versão final do manuscrito; elaboração e redação do manuscrito; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Conflitos de interesse

Nenhum.

Agradecimentos

A Daniel Díaz, Ph.D. por sua assistência na revisão deste manuscrito.

Referências

- Simakou T, Butcher JP, Reid S, Henriquez FL. Alopecia areata: A multifactorial autoimmune condition. *J Autoimmun.* 2019;98:74–85.
- Trüeb RM, Dias MFRG. Alopecia Areata: a Comprehensive Review of Pathogenesis and Management. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;54:68–87.
- Moravvej H, Tabatabaei-Panah PS, Abgoon R, Khaksar L, Sokhandan M, Tarshaei S, et al. Genetic variant association of PTPN22, CTLA4 IL2RA, as well as HLA frequencies in susceptibility to alopecia areata. *Immunol Invest.* 2018;47:666–79.
- Zhang Z, Wang X, Zhang R. Pathogenesis of Alopecia Areata Based on Bioinformatics Analysis. *Indian J Dermatol.* 2019;64:1–6.
- Rajabi F, Drake LA, Senna MM, Rezaei N. Alopecia areata: a review of disease pathogenesis. *Br J Dermatol.* 2018;179:1033–48.
- Seleit I, Bakry OA, Gayed EAE, Gawad AED. Polymorphism of FAS and FAS Ligand Genes in Alopecia Areata: A Case-control Study in Egyptian Population. *Indian J Dermatol.* 2018;63:220–6.
- Paterson AM, Lovitch SB, Sage PT, Juneja VR, Lee Y, Trombley JD, et al. Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J Exp Med.* 2015;212:1603–21.
- John KK, Brockschmidt FF, Redler S, Herold C, Hanneken S, Eigelshoven S, et al. Genetic variants in CTLA4 are strongly associated with alopecia areata. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1169–72.
- Megiorni F, Mora B, Maxia C, Gerardi M, Pizzuti A, Rossi A. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4)+49AG and CT60 gene polymorphisms in Alopecia Areata: a case-control association study in the Italian population. *Arch Dermatol Res.* 2013;305:665–70.
- Sun L, Meng Y, Xie Y, Zhang H, Zhang Z, Wang X, et al. CTLA4 variants and haplotype contribute genetic susceptibility to myasthenia gravis in northern Chinese population. *PLoS One.* 2014;9:e101986.

11. Villasante Fricke AC, Miteva M. Epidemiology and burden of alopecia areata: a systematic review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2015;8:397–403, eCollection 2015.
12. Betz RC, Petukhova L, Ripke S, Huang H, Menelaou A, Redler S, et al. Genome-wide meta-analysis in alopecia areata resolves HLA associations and reveals two new susceptibility loci. *Nat Commun*. 2015;6:5966.
13. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131:58–67.
14. Wang K, Zhu Q, Lu Y, Lu H, Zhang F, Wang X, et al. CTLA-4 + 49 G/A Polymorphism Confers Autoimmune Disease Risk: An Updated Meta-Analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2017;21:222–7.
15. Ting WH, Chien MN, Lo FS, Wang CH, Huang CY, Lin CL, et al. Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study. *PLoS one*. 2016;11:e0154394.
16. Deeba F, Syed R, Quareen J, Waheed MA, Jamil K, Rao H. CTLA-4 A49G gene polymorphism is not associated with vitiligo in South Indian population. *Indian J Dermatol*. 2010;55:29–32.
17. Liang J, Zhang S, Luo Q, Li W, Tian X, Zhang F, et al. Lack of association between cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 + 49A/G polymorphism and psoriasis and vitiligo: A meta-analysis of case-control studies. *Gene*. 2015;568:196–202.
18. Dursun HG, Yilmaz HO, Dursun R, Kulaksizoglu S. Association of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Gene Polymorphisms with Psoriasis Vulgaris: A Case-Control Study in Turkish Population. *J Immunol Res*. 2018;2018:1643906.
19. Salinas-Santander M, Sanchez-Dominguez C, Cantu-Salinas C, Gonzalez-Cardenas H, Cepeda-Nieto AC, Cerda-Flores RM, et al. Association between PTPN22 C1858T polymorphism and alopecia areata risk. *Exp Ther Med*. 2015;10:1953–8.
20. Torres-Carrillo N, Ontiveros-Mercado H, Torres-Carrillo NM, Parra-Rojas I, Rangel-Villalobos H, Ramirez-Duenas MG, et al. The -319C/ + 49G/CT60G haplotype of CTLA-4 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67:1217–28.