



ELSEVIER

REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

Artigo original

Associação entre o polimorfismo rs7700944 no gene TIM-4 e artrite reumatoide em Zahedan, sudeste do Irã

Zahra Zakeri^a, Mohammad Hashemi^{b,c,*}, Seyed Mohammad Ebrahim Pourhosseini^a, Ebrahim Eskandari-Nasab^c, Gholamreza Bahari^c, Mohsen Taheri^d

^aDepartamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Irã

^bCentro de Pesquisa Celular e Molecular, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Irã

^cDepartamento de Bioquímica Clínica, Faculdade de Medicina, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Irã

^dCentro de Pesquisa de Doenças Genéticas Não Comunicáveis, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Irã

INFORMAÇÕES

Histórico do artigo:

Recebido em 11 de setembro de 2012

Aceito em 17 de fevereiro de 2013

Palavras-chave:

Artrite reumatoide

TIM-4

Polimorfismo

RESUMO

Introdução: Recentemente, relatou-se uma associação entre artrite reumatoide (AR) e a variante rs7700944 G>A nos domínios imunoglobulina e mucina de células T (TIM-4).

Objetivo: Investigar o impacto desse polimorfismo na suscetibilidade a AR em uma amostra da população iraniana.

Pacientes e métodos: Este estudo caso-controle foi conduzido em 120 pacientes com AR e 120 indivíduos saudáveis. O polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 foi determinado usando-se o ensaio tetra *amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction* (T-ARMS-PCR).

Resultados: Não se observou diferença significativa quanto ao polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 entre os pacientes com AR e os indivíduos saudáveis. Nas mulheres, não houve associação significativa quanto ao polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 nos dois grupos. Nos homens, o genótipo GA+AA, em comparação ao GG, aumentou o risco para AR (OR = 5,15; IC 95% = 1,30-20,48; P = 0,020). Além disso, os resultados mostraram que o alelo rs7700944 A aumentou o risco para AR (OR = 4,39; IC 95% = 1,43-13,54; P = 0,009).

Conclusão: Nossos resultados não confirmam a existência de associação entre AR e o polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4. Uma interação entre esse polimorfismo e sexo sugere uma associação sexo-específica entre AR e esse polimorfismo de nucleotídeo único, que ainda requer elucidação.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Association between the rs7700944 polymorphism in the TIM-4 gene and rheumatoid arthritis in Zahedan, southeast Iran

ABSTRACT

Introduction: Recently, an association between rheumatoid arthritis (RA) and the rs7700944 G>A variant in the T-cell immunoglobulin and mucin domains 4 (TIM-4) has been reported.

Objective: The present study aimed at investigating the impact of that polymorphism on susceptibility to RA in a sample of the Iranian population.

Patients and methods: This case-control study was conducted on 120 patients with RA and

Keywords:

Vasculitis

Adolescent

Cutaneous lupus erythematosus

* Autor para correspondência.

E-mail: mhd.hashemi@gmail.com; hashemim@zaums.ac.ir (M. Hashemi).

0482-5004/\$ - see front matter. © 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

120 healthy subjects. The rs7700944 polymorphism in the TIM-4 gene was determined using tetra amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (T-ARMS-PCR) assay.

Results: No significant difference was observed regarding the rs7700944 polymorphism of the TIM-4 gene between patients with RA and normal individuals. In females, no significant association was found between the groups concerning the rs7700944 polymorphism of the TIM-4 gene. In males, the GA+AA genotype increased the risk of RA in comparison with the GG genotype (OR = 5.15, 95% CI = 1.30-20.48, P = 0.020). Furthermore the results showed that the rs7700944 A allele increased the risk of RA (OR = 4.39, 95% CI = 1.43-13.54, P = 0.009).

Conclusion: Our results do not support an association between the rs7700944 polymorphism of the TIM-4 gene and RA. An interaction between this polymorphism and sex suggests a sex-specific association between this single nucleotide polymorphism and RA, which remains to be fully elucidated.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica que resulta em lesão grave da cartilagem e destruição óssea nas articulações sinoviais. Embora sua etiologia ainda seja desconhecida, considera-se que a AR sofra influência de uma combinação de fatores genéticos e ambientais.^{1,2} Estima-se que a AR afete cerca de 1% da população adulta do mundo, e que fatores genéticos representem 60% do risco da doença.³

A família dos genes portadores dos domínios mucina e imunoglobulina de células T (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain* – TIM) consiste de três genes localizados no cromossomo 5q23. Três dos membros da família (TIM-1, TIM-3 e TIM-4) são conservados no camundongo e no homem, e codificam glicoproteínas de células superficiais com *motifs* estruturais comuns. Os genes da família TIM codificam proteínas que são expressas por células T e contêm um domínio “IgV-like” e um ‘mucin-like’ e mostraram-se capazes de regular a imunidade adaptativa.^{4,5}

O gene TIM-4 foi identificado como um ligante natural para TIM-1, e a interação de TIM-1 e TIM-4 estimula a proliferação e a ativação de células T.⁶ O gene TIM-4 é um receptor fosfatidilserina (PS) expresso em células maduras de apresentação de antígeno, que aumenta a atividade fagocítica de células apoptóticas por macrófagos para manter a homeostase.⁷ O gene TIM-4 desempenha papel essencial no controle da imunidade adaptativa através da regulação do *clearance* de células antígeno-específicas.⁸ No camundongo, a falta do TIM-4 dificulta o *clearance* de corpos apoptóticos *in vivo*, levando a desregulação da ativação linfocítica e sinais de autoimunidade sistêmica,⁹ indicando que o gene TIM-4 possa estar associado à suscetibilidade a doenças alérgicas e autoimunes. Os polimorfismos dos genes TIM-1 e TIM-3 mostraram-se associados com suscetibilidade a AR.¹⁰⁻¹⁴

Há alguns dados sobre a associação dos polimorfismos do gene TIM-4 e o risco para AR. Recentemente, Xu et al.¹⁵ encontraram uma associação entre a suscetibilidade para AR e o polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 em populações chinesas de etnias Han e Hui. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar o impacto do polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 na suscetibilidade a AR em uma amostra da população iraniana.

Material e métodos

Pacientes

Analisamos a possível associação entre o polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 e a suscetibilidade para AR em 120 pacientes (104 mulheres e 16 homens) com idade média de $44,8 \pm 12,8$ anos, que atendessem aos critérios do American College of Rheumatology (ACR) para diagnóstico de AR.¹⁶ Todos os participantes eram pacientes da Clínica de Reumatologia da Universidade de Ciências Médicas de Zahedan.^{2,17,18} O grupo controle consistiu de 120 indivíduos saudáveis (85 mulheres e 35 homens) com idade média de $44,9 \pm 12,4$ anos e que não tivessem familiares com AR. O comitê de ética da Universidade de Ciências Médicas de Zahedan aprovou o projeto. Todos os pacientes e participantes saudáveis assinaram o termo de consentimento livre e informado. Amostras de sangue foram colhidas dos pacientes e controles saudáveis em tubos Na-EDTA. O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico colhido em tubos contendo EDTA, como descrito em publicação anterior.¹⁸

As sequências genômicas do TIM-4 (NT_023133.13) foram obtidas do National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Procuramos os polimorfismos e desenhamos os *primers* para o ensaio *tetra amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction* (T-ARMS-PCR), que é um método simples e rápido para detectar polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, sigla em inglês)¹⁹ (tabela 1). A figura 1 mostra a representação esquemática.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com a utilização de *premix* PCR comercialmente disponível (AccuPower PCR PreMix; BIONEER, Daejeon, Coreia) segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, 1 μ L de *template* de DNA (~100 ng/ μ L), 1 μ L de cada *primer* (10 pmol/ μ L) e 15 μ L de água sem DNase foram adicionados ao AccuPower PCR PreMix.

Realizou-se a amplificação com um estágio de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 22 segundos a 62 °C, e 25 segundos a 72 °C, com etapa final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram verificados em gel agarose 2,0% contendo 0,5 μ g/mL de

Tabela 1 – As seqüências de primers utilizadas para a detecção do polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 por meio do ensaio T-ARMS-PCR

Primers	Seqüência (5' a 3')	Tamanho dos amplicons
FO	TCTGGTGTCTTCTGTCTAGCTCCTTAG	364 bp
RO	TTGTGAGCAATTGTCTGAATCTATGAGG	
FI (alelo G)	CTAATGAGGCAAGACAATAAAGTGTGTCAG	168 bp
RI (alelo A)	TCTCTTTGGTGCTTGAACCTGAGATT	252 bp

FO, forward outer; RO, reverse outer; FI, forward inner; RI, reverse inner.

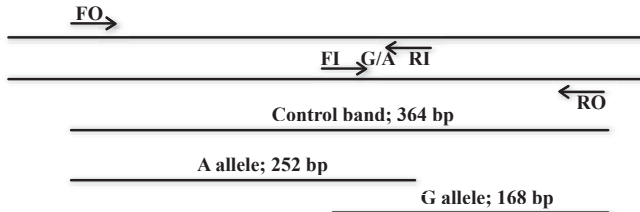


Figura 1 – Representação esquemática do ensaio de reação em cadeia da polimerase (T-ARMS-PCR) para detecção do polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4. Dois primers forward e dois reverse foram usados para gerar três potenciais produtos de PCR. Os primers FO e os RO forneceram um produto de 364 bp (faixa controle). Os primers FO e os RI amplificaram o alelo A, gerando um produto de 252 bp, e os primers FI e RO geraram um produto de 168-bp para o alelo G.

brometo de etídio. Fotografias foram feitas (fig. 2). Para confirmar a qualidade da genotipagem, todos os polimorfismos em amostras aleatórias foram regenetipados.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando-se o programa SPSS 18. O equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) foi estimado separadamente para casos e controles. As associações entre genótipos do gene TIM-4 e AR foram avaliadas por *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança a 95% (IC 95%) de análises de regressão logística ajustadas para sexo e idade.

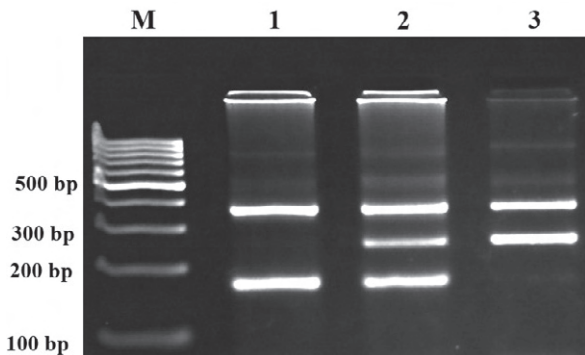


Figura 2 – Fotografia do produto de PCR do polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4. Os tamanhos dos produtos foram de 168 bp para o alelo G, 252 bp para o alelo A e 364 bp para dois primers outer (faixa de controle). Linha M, marcador de DNA; linha 1, rs7700944 GG; linha 2, GA; linha 3, AA.

Resultados

Não houve diferença significativa entre os grupos com relação à idade ($P = 0,815$), mas houve com relação ao sexo ($P < 0,05$).

A tabela 2 mostra o genótipo e as frequências alélicas do polimorfismo rs7700944 em pacientes com AR e em controles. Os grupos não diferiram significativamente quanto ao polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 ($\chi^2 = 2,253$; $P = 0,324$). Esse polimorfismo não se associou a suscetibilidade a AR nem a proteção contra AR em modelos testados de herança codominante (OR = 1,17; IC 95% = 0,68-2,01; $P = 0,557$, GA vs. GG; e OR = 3,07; IC 95% = 0,55-17,02; $P = 0,200$; AA vs. GG), dominante (OR = 1,25; IC 95% = 0,74-2,13; $P = 0,410$; GA+AA vs. GG) e recessiva (OR = 2,90; IC 95% = 0,53-15,98; $P = 0,221$; AA vs. GG+GA) (tabela 2).

Os grupos também não diferiram significativamente quanto à frequência alélica ($\chi^2 = 1,79$; $P = 0,180$). O genótipo no polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 nos grupos caso e controle estava em HWE ($\chi^2 = 0,794$; $P = 0,372$; e $\chi^2 = 1,762$; $P = 0,183$, respectivamente).

Realizou-se análise do polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4, tendo sexo como covariável e ajustando-se para idade (tabela 3). Nas mulheres, não se observou associação significativa nos grupos quanto ao polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4. Nos homens, o genótipo GA+AA aumentou o risco para AR em comparação ao GG (OR = 5,15; IC 95% = 1,30-20,48; $P = 0,020$). Além disso, os resultados mostraram que o alelo rs7700944 A aumentou o risco para AR (OR = 4,39; IC 95% =

Tabela 2 – Genótipo e frequências alélicas do polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 em indivíduos com artrite reumatoide e saudáveis

rs7700944 G>A	AR n (%)	Controle n (%)	^a OR (IC 95%)	P
Codominante				
GG	68 (56,6)	77 (64,2)	1,00	—
GA	47 (39,2)	41 (34,2)	1,17 (0,68-2,01)	0,557
AA	5 (4,2)	2 (1,6)	3,07 (0,55-17,02)	0,200
Dominante				
GG	68 (56,6)	77 (64,2)	1,00	—
GA+AA	52 (43,4)	43 (35,8)	1,25 (0,74-2,13)	0,410
Recessivo				
GG+GA	115 (95,8)	118 (98,4)	1,00	—
AA	5 (4,2)	2 (1,6)	2,90 (0,53-15,98)	0,221
Alelo				
G	183 (76,3)	195 (81,3)	1,00	—
A	57 (23,7)	45 (18,7)	1,35 (0,87-2,09)	0,181

AR, artrite reumatoide; OR, *odds ratio*; IC 95%, intervalos de confiança de 95%.

^aAjustado para sexo e idade.

Tabela 3 – Genótipo e frequências alélicas do polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 em indivíduos com artrite reumatoide e saudáveis, distribuídos por sexo

rs7700944	Feminino				Masculino			P
	Caso (n)	Controle (n)	^a OR (IC 95%)	P	Caso (n)	Controle (n)	^a OR (IC 95%)	
Codominante								
GG	60	48	1,00	—	8	29	1,00	—
GA	41	35	0,94 (0,52-1,69)	0,85	6	6	3,77 (0,89-15,97)	0,071
AA	3	2	1,19 (0,19-7,77)	0,89	2	0	—	—
Dominante								
GG	60	48	1,00	—	8	29	1,00	—
GA+AA	44	37	0,95 (0,53-1,70)	0,87	8	6	5,15 (1,30-20,48)	0,020
Recessivo								
GG+GA	101	83	1,00	—	14	35	1,00	—
AA	3	2	1,17 (0,20-7,20)	0,87	2	0	—	—
Alelo								
G	161	131	1,00	—	22	58	1,00	—
A	47	39	0,98 (0,60-1,59)	0,96	10	6	4,39 (1,43-13,54)	0,009

OR, odds ratio; IC 95%, intervalo de confiança de 95%.
^aAjustado para idade.

1,43-13,54; P = 0,009). Descobrimos ainda uma interação entre polimorfismo rs7700944 e sexo, sugerindo uma associação sexo-específica entre esse SNP e AR.

Discussão

O presente estudo avaliou a associação do polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 com a suscetibilidade a AR em uma amostra da população iraniana. Não se observou associação significativa entre polimorfismo rs7700944 e AR. O genótipo GA+AA, em comparação ao GG, aumentou o risco de AR em homens, sugerindo a existência de associação sexo-específica entre esse SNP e AR. Os estudos sobre os polimorfismos do gene TIM-4 e AR são poucos e controversos. Xu et al.¹⁵ investigaram o polimorfismo rs7700944 de íntron do gene TIM-4 em populações chinesas de etnias Han e Hui. Os autores relataram que o genótipo GA do polimorfismo rs7700944 aumentou o risco de AR na população chinesa de etnia Han, mas mostrou-se protetor na população chinesa de etnia Hui. De maneira semelhante, o genótipo GG foi o genótipo de risco para AR na etnia Hui, mas pode ser um genótipo protetor na etnia Han.¹⁵ Embora o alelo G tenha se mostrado mais frequente nas duas etnias, o alelo do polimorfismo rs7700944 que representa risco para AR diferiu nas duas populações como se segue: na etnia Hui, o alelo de risco foi o G (OR = 1,823; IC 95% = 1,330-2,498; P < 0,01), enquanto na etnia Han, indivíduos com o alelo A nesse sítio de SNP mostraram-se mais suscetíveis a AR (OR = 1,930; IC 95% = 1,412-2,636; P < 0,01).¹⁵

Segundo nossos achados, o genótipo AA não foi comum. Nossos resultados estão de acordo com aqueles relatados por Xu et al.,¹⁵ que descobriram que o genótipo AA não era comum nas populações chinesas Han e Hui. Descobrimos ainda que existe uma interação entre polimorfismo rs7700944 e sexo, sugerindo uma associação sexo-específica entre esse SNP e AR.

Polimorfismos do gene TIM-4 foram associados com asma²⁰ e dermatite atópica (DA).²¹ Polimorfismos do gene TIM-3 foram associados com AR,¹⁰⁻¹² câncer de pâncreas,²² carci-

noma de células renais,²³ câncer gástrico,²⁴ suscetibilidade a doenças e carcinoma hepatocelular associado com infecção pelo vírus da hepatite B.²⁵ Polimorfismo do gene TIM-1 foi associado com AR,^{13,14,26} rinite alérgica²⁷ e DA.²¹

Uma das limitações do nosso estudo foi o tamanho relativamente pequeno da amostra, em particular, na análise de genótipo e sexo. Outra limitação foi a diferença estatística significativa quanto ao sexo entre os pacientes e os controles. É possível que tal diferença não tenha um impacto significativo nos resultados, uma vez que sexo foi utilizado como covariável na análise de regressão.

Concluindo, não se observou associação significativa entre o polimorfismo rs7700944 do gene TIM-4 e AR em uma amostra da população iraniana. No entanto, identificou-se uma interação entre polimorfismo rs7700944 e sexo, sugerindo uma associação sexo-específica entre esse SNP e AR. Tal associação sexo-específica entre o polimorfismo rs7700944 e AR deve ser interpretada com cautela, devido ao pequeno tamanho da amostra. Estudos adicionais sobre tal associação com amostras maiores e diferentes etnias são necessários para confirmar nossos achados.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte da Universidade de Ciências Médicas de Zahedan. Agradecemos a todos os participantes do estudo.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Ghelani AM, Samanta A, Jones AC, Mastana SS. Association analysis of TNFR2, VDR, A2M, GSTT1, GSTM1, and ACE genes with rheumatoid arthritis in South Asians and Caucasians

- of East Midlands in the United Kingdom. *Rheumatol Int.* 2011;31(10):1355-61.
2. Hashemi M, Moazeni-Roodi AK, Fazaeli A, Sandoughi M, Taheri M, Bardestani GR, et al. The L55M polymorphism of paraoxonase-1 is a risk factor for rheumatoid arthritis. *Genet Mol Res.* 2010;9(3):1735-41.
 3. Turesson C, Matteson EL. Genetics of rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(1):94-101.
 4. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(6):454-62.
 5. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med.* 2005;11(8):362-9.
 6. Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol.* 2005;6(5):455-64.
 7. Nurtanio N, Yang PC. Role of TIM-4 in innate or adaptive immune response. *N Am J Med Sci.* 2011;3(5):217-21.
 8. Albacker LA, Karisola P, Chang YJ, Umetsu SE, Zhou M, Akbari O, et al. TIM-4, a receptor for phosphatidylserine, controls adaptive immunity by regulating the removal of antigen-specific T cells. *J Immunol.* 2010;185(11):6839-49.
 9. Rodriguez-Manzanet R, Sanjuan MA, Wu HY, Quintana FJ, Xiao S, Anderson AC, et al. T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(19):8706-11.
 10. Chae SC, Park YR, Shim SC, Yoon KS, Chung HT. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2004;95(1):91-5.
 11. Xu J, Yang Y, Liu X, Wang Y. The -1541 C>T and +4259 G>T of TIM-3 polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Chinese Hui population. *Int J Immunogenet.* 2011;38(6):513-8.
 12. Song YW, Im CH, Park JH, Lee YJ, Lee EY, Lee EB, et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 genetic polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis independent of a shared epitope status. *Hum Immunol.* 2011;72(8):652-5.
 13. Xu JR, Yang Y, Liu XM, Sun JY, Wang YJ. Polymorphisms of the TIM-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in the Chinese Hui minority ethnic population. *Genet Mol Res.* 2012;11(1):61-9.
 14. Chae SC, Song JH, Shim SC, Yoon KS, Chung HT. The exon 4 variations of Tim-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315(4):971-5.
 15. Xu J, Yang Y, Liu X, Wang Y. Genetic variation and significant association of polymorphism rs7700944 G>A of TIM-4 gene with rheumatoid arthritis susceptibility in Chinese Han and Hui populations. *Int J Immunogenet.* 2012;39(5):409-13.
 16. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):315-24.
 17. Sandoughi M, Fazaeli A, Bardestani G, Hashemi M. Frequency of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis patients in Zahedan, southeast Iran. *Ann Saudi Med.* 2011;31(2):171-3.
 18. Hashemi M, Moazeni-Roodi AK, Fazaeli A, Sandoughi M, Bardestani GR, Kordi-Tamandani DM, et al. Lack of association between paraoxonase-1 Q192R polymorphism and rheumatoid arthritis in southeast Iran. *Genet Mol Res.* 2010;9(1):333-9.
 19. Hashemi M, Moazeni-Roodi A, Bahari A, Taheri M. A Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction for the Detection of rs8099917 IL28B Genotype. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2012;31(1):55-60.
 20. Zhao B, Abdelmoudjib G, Li J, Li H, Wei C, Gong Y, et al. Two polymorphisms in the TIM-4 gene are associated with asthma in a Chinese Han population. *Int J Immunogenet.* 2011;38(1):31-5.
 21. Page NS, Jones G, Stewart GJ. Genetic association studies between the T cell immunoglobulin mucin (TIM) gene locus and childhood atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;141(4):331-6.
 22. Tong D, Zhou Y, Chen W, Deng Y, Li L, Jia Z, et al. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 3 gene polymorphisms and susceptibility to pancreatic cancer. *Mol Biol Rep* 2012.
 23. Cai C, Wang L, Wu Z, Li M, Chen W, Sun Y. T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 3 gene polymorphisms and renal cell carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2012;31(7):1285-9.
 24. Cao B, Zhu L, Zhu S, Li D, Zhang C, Xu C, et al. Genetic variations and haplotypes in TIM-3 gene and the risk of gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59(12):1851-7.
 25. Li Z, Liu Z, Zhang G, Han Q, Li N, Zhu Q, et al. TIM3 gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis B virus infection: impact on disease susceptibility and hepatocellular carcinoma traits. *Tissue Antigens.* 2012;80(2):151-7.
 26. Chae SC, Park YR, Song JH, Shim SC, Yoon KS, Chung HT. The polymorphisms of Tim-1 promoter region are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population. *Immunogenetics.* 2005;56(10):696-701.
 27. Mou Z, Shi J, Tan Y, Xu R, Zhao Z, Xu G, et al. Association between TIM-1 gene polymorphisms and allergic rhinitis in a Han Chinese population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010;20(1):3-8.