

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Ronald Rodrigues de Moura

**Associação de polimorfismos no gene *IFIH1* com a Diabetes tipo 1 e outras
doenças autoimunes**

Recife,
2014

Ronald Rodrigues de Moura

**Associação de polimorfismos no gene *IFIH1* com a Diabetes tipo 1 e outras
doenças autoimunes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão

Recife,
2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Moura, Ronald Rodrigues de
Associação de polimorfismos no gene *IFIh1* com a diabetes tipo 1 e outras
doenças autoimunes/ Recife: O Autor, 2014.

73 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Imunogenética 2. Polimorfismo (genética) 3. Diabetes I.
Brandão, Lucas André Cavalcanti (orientador) II. Título

571.9648

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 168

Ronald Rodrigues de Moura

Associação de polimorfismos no gene *IFIH1* com a Diabetes tipo 1 e outras doenças autoimunes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Situação: Aprovado

19/02/2014

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão/ UFPE - Patologia

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza/UFRPE - Biologia

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra/UFPE - Biofísica

Prof. Dr. Sergio Crovella/ UFPE – Genética

Recife,
2014

Aos pacientes e indivíduos não afetados.

AGRADECIMENTOS

Externo meus sinceros agradecimentos aos colegas de trabalho que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento das atividades aqui apresentadas em especial ao meu orientador Professor Lucas Brandão por me dar liberdade nas pesquisas e ao Professor Sergio Crovella, que me deu a oportunidade de interagir com outros grupos de pesquisa no exterior; a Universidade Federal de Pernambuco e aos órgãos de fomento (CAPES, CNPq e FACEPE) por incentivar a minha formação e a pesquisa que venho desenvolvendo; a todos os professores da Pós Graduação em Genética, que estimularam o pensamento crítico sobre os meus trabalhos.

“CAVEIRA!”
(Autor desconhecido)

RESUMO

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune multifatorial caracterizada por danos e destruição de células-beta, nas Ilhotas de Langerhans no pâncreas, reduzindo ou inviabilizando a produção de insulina. Estudos apontam que infecções virais, principalmente enterovírus, têm sido consideradas um dos principais fatores ambientais associados com a DM1. A proteína codificada pelo gene Helicase C induzida por interferon tipo 1 (*IFIH1*) participa do reconhecimento de vírus de dsRNA e no desenvolvimento da DM1, o que sugere uma possível etiologia viral da DM1 e outras desordens autoimunes como a doença autoimune da tireóide (DAIT) e doença celíaca (DC). Este estudo teve como objetivo avaliar a associação entre os polimorfismos de base única (SNP) não-sinônimos do *IFIH1* rs3747517, rs1990760 e rs10930046, além do tag-SNP rs6432714, com a DM1 e a insurgência de DC e DAIT nesses pacientes. Não foi observada associação desses SNPs com o desenvolvimento da DM1, nem com a insurgência de DC ou DAIT. Entretanto, o tag-SNP rs6432714 indicou uma tendência de associação apenas com o desenvolvimento da DM1 ($P=0,0365$). A Análise *in silico* do domínio helicase indicou um aumento na estabilidade da proteína, quando ocorre a mutação H460R, entretanto essa variação estrutural observada não parece ser suficiente para causar uma deficiência na detecção do dsRNA viral. Apesar da evidência de não-associação do rs1990760 na população estudada, uma meta-análise realizada confirma a associação dessa variante com a DM1.

Palavras-chave: Imunogenética; Estudos de associação genética; Autoimunidade; Variação genética.

ABSTRACT

Type 1 diabetes is a multifactorial disease characterized by damages to beta-cells at the Langerhans' islets in the pancreas, impairing the insulin production. Studies show that viral infections, mostly by enterovirus, are considered one the major environmental factors involved with T1D. The protein codified by the interferon-induced helicase gene (*IFIH1*) plays a role on the dsRNA virus and on the T1D onset, suggesting a possible viral aetiology of T1D and others autoimmune diseases, such as autoimmune thyroiditis (AITD) and celiac disease (CD). This study aimed to evaluate the association between the non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the *IFIH1* gene rs3747517, rs1990760 and rs10930046, plus the tag-SNP rs6432714, with T1D and the insurgence of AITD and CD in these patients. We did not find evidences for association between the SNPs with T1D nor the occurrence of AITD or CD. However, the tag-SNP rs6432714 presented a trend for association with the T1D development ($P = 0.0365$). An *in silico* analysis of the Helicase domain shown an increase in the stability of the protein when the H460R mutation occur, although this structural variation appears not to be sufficient to cause an impairment in the dsRNA recognizing. Despite, the evidence for not association of the rs1990760 SNP in the studied population, a meta-analysis indicates confirms the association between this variant and T1D.

Key Words: Immunogenetics; Genetic association study; Autoimmunity; Genetic variation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Incidência da diabetes mellitus tipo 1 em vários países.	16
Figura 2. Modelos autoimunes para a patogénia da diabetes mellitus tipo 1: modelo linear (A) e modelo não-linear (B).	18
Figura 3. Evolução histórica das descobertas de fatores genéticos envolvidos na diabetes mellitus tipo 1. Note que o efeito dos polimorfismos descobertos (OR) diminui com o tempo.	20
Figura 4. Gráfico indicando o risco relativo dos principais <i>loci</i> não-HLA envolvidos na diabetes mellitus tipo 1.	22
Figura 5. Distribuição dos polimorfismos de base única (SNPs) no gene <i>IFIH1</i> mais estudados na diabetes mellitus tipo 1 e outras doenças autoimunes.	28
Figura 6. Esquema funcional da via de detecção de RNA através de receptores <i>RIG-I-like</i> .	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos virais associados com a diabetes mellitus tipo 1.

23

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
CD4+	<i>Cluster of differentiation 4+</i>
CD8+	<i>Cluster of differentiation 8+</i>
AAI	anticorpo anti-insulina
GADA	anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico
IA2	anticorpo antitirosina fosfatase
SPAI	Síndrome poliglandular autoimune tipo II
SPAIII	Síndrome poliglandular autoimune tipo III
TNF- α	fator de necrose tumoral
HLA	<i>Human leucocitary antigen</i>
SNP	polimorfismos de base única
CNV	variações no número de cópias
IPEX	<i>immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i>
APS-I	<i>autoimmune polyendocrine syndrome type 1</i>
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
PTPN22	proteína tirosino-fosfatase não receptora tipo 22 (linfóide)
CTLA4	antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
PGV	proteína genômica viral
PCR	Polymerase chain reaction
CVB4	Coxsackievirus B4
NOD	camundongos diabéticos não-obesos
IFIH1	Helicase C domínio 1 indutora de interferon tipo 1
AR	Artrite Reumatóide
EM	esclerose múltipla
LES	Lupus eritematoso sistêmico
CARD	domínio de recrutamento de caspase
IFN	interferon
dsRNA	RNA de fita dupla
PRK	proteína quinase R
TLR	receptores toll-like

VSV
ECMCV
siRNA
IL-2

vírus da estomatite vesicular
vírus da encefalomiocardite
RNA silenciador
interleucina 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	15
2.2 PATOLOGIA	17
2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	18
2.4 FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA DM1	19
2.4.1 Formas monogênicas da Diabetes mellitus tipo 1	20
2.4.2 Locus HLA	21
2.4.3 Outros genes associados com a DM1	21
2.5 FATORES AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA DM1	22
2.5.1 Infecções virais	23
2.5.1.1 Infecções por Enterovírus	24
2.5.2 Outros fatores ambientais	25
2.5.2.1 Infecções bacterianas	25
2.5.2.2 Proteínas do leite de vaca	26
2.5.2.3 Proteínas do trigo	26
2.5.2.4 Vitamina D	27
2.6 IFIH1: CARACTERÍSTICAS DO GENE DE SEU PAPEL NA IMUNIDADE INATA	27
2.6.1 Características do gene e da proteína	27
2.6.2 O Papel da IFIH1 na imunidade contra infecções virais	28
2.6.3 IFIH1 e a Diabetes mellitus tipo 1	31
2.6.3.1 Polimorfismos do gene IFIH1 relacionados com a DM1	31
2.6.4 Polimorfismos no gene IFIH1 estudados em outras doenças autoimunes e infecciosas	32
3 OBJETIVOS	34

3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MÉTODOS	35
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A – INTERFERON INDUCED WITH HELICASE C DOMAIN 1 (IFIH1): TRENDS ON HELICASE DOMAIN AND TYPE 1 DIABETES ONSET	48
APÊNDICE B – <i>STAT4</i> AND <i>IFIH1</i> POLYMORPHISMS AND META-ANALYSIS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS PATIENTS WITH AUTOIMMUNE POLYGLANDULAR SYNDROME TYPE III	53
ANEXO A – INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA DIABETES & METABOLISM	71

1 INTRODUÇÃO

As doenças com causas multifatoriais consistem na maioria das patologias que ocorrem em humanos. Por ter uma etiologia complexa, a descoberta de todos os fatores associados (genéticos e ambientais) aos seus desenvolvimentos se torna uma tarefa bastante extensa ou até mesmo inviável o que reflete na dificuldade de um sistema de diagnóstico antecipado e de um esquema de tratamento buscando a cura.

Variações genéticas desempenham um papel ubíquo na etiologia das doenças multifatoriais, porém com importância variada dentre as diversas doenças multifatoriais. Mesmo com o avanço tecnológico no processamento da informação genética que ocorreu de forma bastante pronunciada nos últimos anos, as bases genéticas das doenças multifatoriais parecem estar longe de serem elucidadas.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa vem estudando doenças multifatoriais com um objetivo mais voltado à descoberta de variantes genéticas informativas para um diagnóstico prévio e prognóstico, visando desvendar as causas genéticas das patologias. Dentre os diversos estudos já realizados pelo nosso grupo, o presente estudo avalia o papel de variantes genéticas no gene *IFIH1* como um possível marcador preditivo para o diagnóstico da diabetes mellitus tipo 1 na população pernambucana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A seguir está apresentada a revisão de literatura pertinente ao tema do presente estudo.

2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma desordem autoimune que ocorre em indivíduos geneticamente susceptíveis sendo possivelmente desencadeada por fatores ambientais (VAN BELLE et al., 2011). O sistema imune do próprio indivíduo ataca as células- β nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, destruindo ou danificando as células suficientemente para reduzir, e eventualmente anular, a produção de insulina (VAN BELLE et al., 2011).

Dados emergentes da instituição Diabetes Mondiale indicam que a incidência de DM1 varia largamente entre e dentro dos países (DIAMOND, 2006). África, América Central e do Sul e a Ásia apresentam baixas taxas de DM1, enquanto que países da América do Norte, do Norte Europeu, além da Austrália e da Nova Zelândia apresentam as maiores taxas de incidência (Figura 1). Esse dado é corroborando entre várias organizações multinacionais que avaliam a distribuição epidemiológica da DM1 (EURODIAB, 2000; DIAMOND, 2006; GAN et al., 2012).

A incidência da DM1 varia de 0,1 por 100.000 habitantes, em Países como China e Venezuela, a aproximadamente 41 por 100.000 habitantes por ano, na Finlândia (DIAMOND, 2006). Com base nos dados obtidos na década de 1990, é possível observar uma tendência ao aumento na incidência da doença de 2,4% a 3,2% casos por ano (GAN et al., 2012).

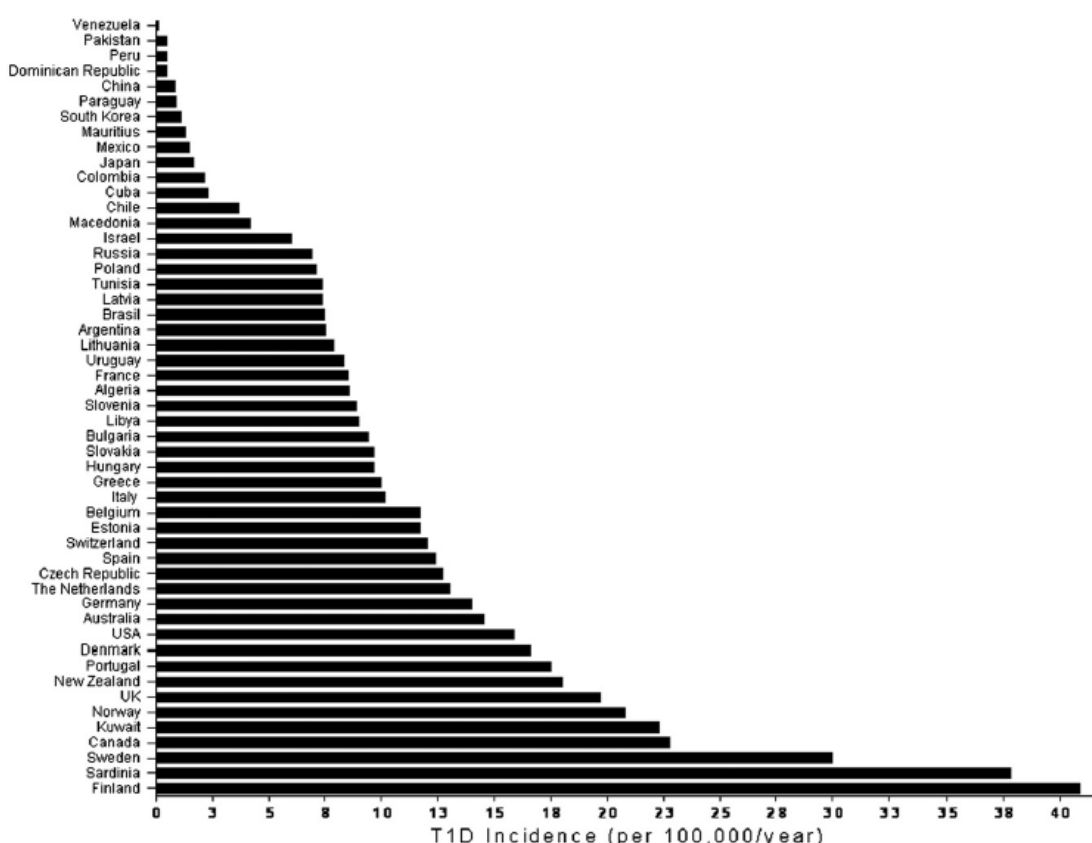
Dados combinados dos Registros de estudo sobre DM1 do Colorado e o projeto “*SEARCH for diabetes in youth*” indicam que a incidência dessa doença tem aumentado nas últimas três décadas de 14,8 por 100.000 indivíduos/ano, na década de 1980, para 23,9 por 100.000 habitantes/ano, entre os anos de 2002 e 2004 (GAN et al., 2012).

Na Figura 1 é possível observar um gradiente geográfico da incidência da DM1. As razões para a ocorrência desse gradiente ainda não são bem compreendidas, entretanto diferenças climáticas, na alimentação, no estilo de vida, além de uma maior

incidência de determinadas infecções virais e crianças do Hemisfério Norte comparadas às do Hemisfério Sul podem estar envolvidos nessa variação (ZIPRIS, 2009). Esses dados indicam a importância dos fatores ambientais no desenvolvimento da DM1 em diversos países com diversas características socio-econômicas e ambientais.

A DM1 ocorre mais em crianças do que em adultos. Mais que 85% dos casos de DM1 são diagnosticados em indivíduos com idade inferior a 20 anos (GAN et al., 2012). Apesar do pico de incidência da DM1 ser em jovens na faixa etária de 10 a 14 anos, dados recentes apontam o maior aumento na incidência da doença em pacientes com idade entre zero e 4 anos (PATTERSON et al., 2009). Com relação ao gênero, a distribuição da DM1 é praticamente balanceada em relação à taxa mulher/homem (STIPANCIC et al., 2008).

Figura 1. Incidência da diabetes mellitus tipo 1 em vários países



Fonte: ZIPRIS, 2009.

2.2 PATOLOGIA

Os fatores de iniciação da DM1 ainda não foram completamente elucidados, entretanto sabe-se que múltiplos tipos celulares do sistema imune medeiam o processo de destruição das células-beta (BENDING et al., 2012). Por conta da influência de caráter genético, ambiental e da interação desses fatores nos processos imunológicos, a DM1 pode ser considerada uma doença autoimune complexa, ou seja, multifatorial (PINO et al., 2010; STECK; REWERS, 2011; KNIP; SIMELL, 2012).

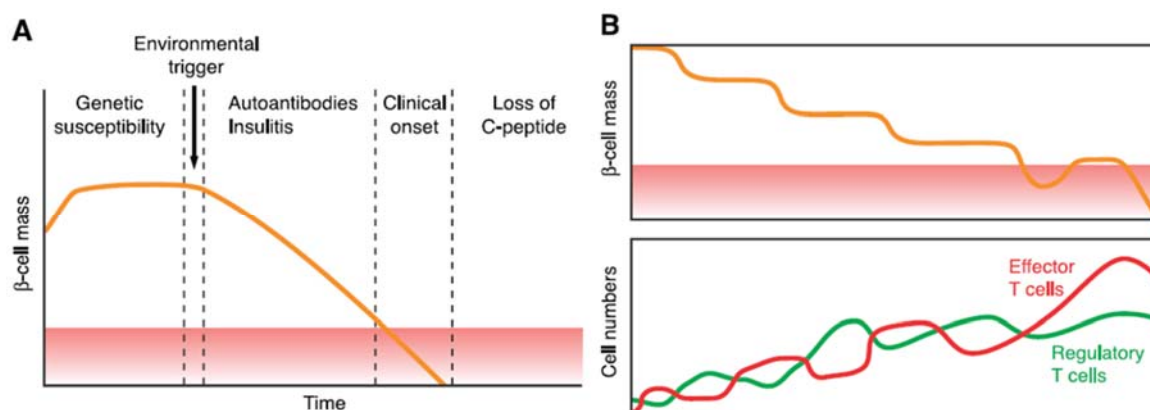
Essa doença é caracterizada pela progressiva infiltração de, principalmente, macrófagos, células T CD4+ e CD8+ nas ilhotas pancreáticas, resultando em um processo inflamatório (insulite) e consequentemente prejudicando a produção de insulina (BENDING et al., 2012).

Dois modelos principais sugerem uma explicação para o progressivo decréscimo de células- β por conta de processos autoimunes: O modelo linear e o modelo não-linear (Figura 2).

A hipótese de declínio linear de células-beta postulado por Eisenbarth (1986) ressalta que indivíduos geneticamente susceptíveis em algum momento entra em contato com agentes ambientais (vírus, por exemplo) que iniciam a autoimunidade nas ilhotas, levando a um decaimento da massa de células-beta, desenvolvimento de autoanticorpos, hiperglicemia, e, eventualmente, perda de peptídeo C.

O Modelo não-linear (BONIFACIO et al., 1999) estabelece que o decaimento da massa de células-beta nas ilhotas ocorre de forma intercalada entre uma fase de declínio e uma fase de estase que se dá por conta do equilíbrio dinâmico entre a quantidade de populações de células T efectoras e reguladoras. Esse balanço ocorre pela intensidade da resposta das células T aos estímulos das células da imunidade inata (VAN BELLE et al., 2011). Portanto, variações em genes relacionados com a regulação da resposta imune à autoantígenos e infecções tem um papel fundamental nesse sistema.

Figura 2. Modelos autoimunes para a patogenia da diabetes mellitus tipo 1: modelo linear (A) e modelo não-linear (B).



Fonte: Adaptado de Van Belle, et al. (2011).

2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da DM1 é feito com base nos níveis séricos de glicose, além de ensaios envolvendo auto-anticorpos como o anticorpo anti-insulina (AAI), o anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico (GADA) e o anticorpo antitirosina fosfatase (IA2) (VERGE et al., 1998; LESLIE et al., 1999). Acredita-se que 90% das crianças com DM1 apresentam positividade para ao menos um desses anticorpos durante o diagnóstico (ATKINSON; EISENBARTH, 2001).

Indivíduos com DM1 apresentam um risco maior ao desenvolvimento de outras doenças autoimunes órgão-específicas, como a tireoidite autoimune (VILLANO, et al., 2009), doença de Addison (KAHALY, 2009), que acomete a glândula adrenal e a doença celíaca (CAMARCA et al., 2012), que está relacionada com o intestino. O diagnóstico para essas doenças é comumente realizado em pacientes com DM1, e quando confirmado, o indivíduo pode ser considerado como portador de síndrome poliglandular autoimune tipo II (SPaII), quando envolve uma combinação da DM1 com tireoidite e doença de Addison, ou tipo III (SPaIII), quando é observado apenas a DM1 em conjunto com a tireoidite autoimune (KAHALY, 2009).

Além da insurgência de outras doenças autoimunes, indivíduos com DM1 também desenvolvem complicações envolvendo outros órgãos e tecidos. De um modo geral, essas complicações são de ordem vascular acometendo a retina, rins, coração, cérebro e nervos periféricos (STEHN-BITTEL, 2012).

Além do tratamento convencional com injeções de insulina e do transplante de pâncreas, diversas estratégias de tratamento para a DM1 vem sendo desenvolvidas, mas a eficácia desses tratamentos é controversa. Os métodos mais promissores estão relacionados com:

- A combinação de terapias com moduladores autoimunes, como o anti-CD3 F(ab')₂ FcR-não ligante, e vacinas antigênicas nas ilhotas (BRESSON et al., 2006, 2010);
- Combinação de imuno-moduladores e acentuadores do desenvolvimento e função das células-beta (SUAREZ-PINZON et al., 2008);
- Terapias com citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas 2, 15 e 18 (ROTHER et al., 1999; SUTHERLAND et al., 2009).

2.4 FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA DM1

O risco de se desenvolver a DM1 é determinado por complexas interações entre a constituição genética do indivíduo e o ambiente no qual ele se desenvolve. As evidências da influência genética sobre o fenótipo observado em pacientes com DM1 podem ser observadas pelo alto risco de desenvolvimento da doença em parentes (7%), principalmente entre gêmeos idênticos, que é de 50%, em relação ao risco na população de um modo geral (0,4%) (KYVIK et al., 1995; REDONDO et al., 2001, 2008).

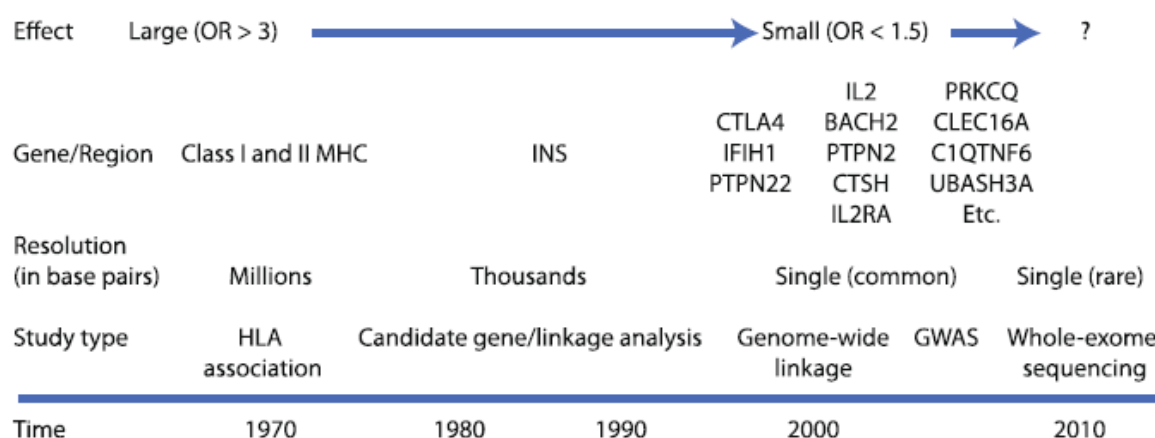
Os estudos de associação vem identificando diversos marcadores genéticos associados tanto com a proteção quanto com a susceptibilidade à DM1. Os primeiros marcadores relacionados com a susceptibilidade à diabetes mellitus tipo 1 foram polimorfismos do *locus* do antígeno leucocitário humano (*HLA*) nos anos 70 (ESPINO-PAISÁN et al., 2009), e desde então vários outros polimorfismos de base única (SNPs) associados com a DM1 continuam sendo encontrados pelo genoma (Figura 3).

Duas abordagens são utilizadas na busca de SNPs com a DM1: Estudos de genes candidatos e estudos de associação genômica. Estudos de associação de genes candidatos utilizam do conhecimento *a priori* de genes que indicam alguma relação com a doença, portanto, limitando-se a uma pequena quantidade de SNPs, ou ainda *tag*-SNPs (SNPs que representam um agrupamento de outros SNPs em desequilíbrio de ligação). Enquanto que os estudos de associação genômica não

necessitam de um conhecimento prévio de SNPs possivelmente relacionados com a DM1, analisando centenas (ou até milhares) de SNPs simultaneamente (LUNETTA, 2008).

Recentemente, dois novos tipos de marcadores vem sendo utilizados nos estudos de associação genética: microRNAs e variações no número de cópias (CNV). Ambos estão relacionados com a regulação da expressão de genes que podem estar associados com a patogenia de doenças como a DM1 (ESPINO-PAISÁN et al., 2009; WTCCC, 2010).

Figura 3. Evolução histórica das descobertas de fatores genéticos envolvidos na diabetes mellitus tipo 1. Note que o efeito dos polimorfismos descobertos (OR) diminui com o tempo



Fonte: STECK; REWERS, 2011.

2.4.1 Formas monogênicas da Diabetes mellitus tipo 1

Apesar da DM1 ser bem caracterizada como uma doença autoimune multifatorial é possível encontrar casos de pacientes com formas monogênicas da doença. Casos como esse são raros e geralmente acompanhados de outras doenças autoimunes (VAN BELLE et al., 2011). Atualmente são conhecidas duas formas monogênicas da DM1: a síndrome IPEX e a APS-I.

A desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X (do inglês *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), ou IPEX, é uma síndrome que está relacionada com mutações no gene que codifica para o fator de transcrição Foxp3, que levam a uma disfunção de células T regulatórias (BACCHETTA et al., 2006).

A síndrome poliendócrina autoimune (do inglês *autoimmune polyendocrine syndrome type 1*), ou APS-I, também consiste em uma síndrome autoimune causada por mutações no fator de transcrição AIRE, que está relacionado com o estímulo da produção de moléculas do timo, que permite a evasão de linfócitos autorreativos durante o processo de autotolerância (VILLASENOR et al., 2005).

2.4.2 Locus HLA

Dentre as regiões do genoma humano que mais contribuem para o desenvolvimento do DM1, destaca-se o *locus* gênico altamente polimórfico do complexo principal de histocompatibilidade (MHC classe I, II e III; ou Antígeno Leucocitário Humano, HLA) localizado no cromossomo 6p21. Os alelos HLA-DRB1, HLA-DQA1 e HLA-DQB1, do MHC classe II são as principais variações envolvidas com o DM1, sendo assim chamados de *locus* principal para esta doença (ESPINO-PAISÁN et al., 2009) com uma contribuição genética estimada em até 50% (NOBLE et al., 1996). Esse resultado indica que o somatório da contribuição genética de todos os outros genes e outras regiões genômicas relacionados com o fenótipo da DM1 corresponde aos outros 50% da variação genética da doença.

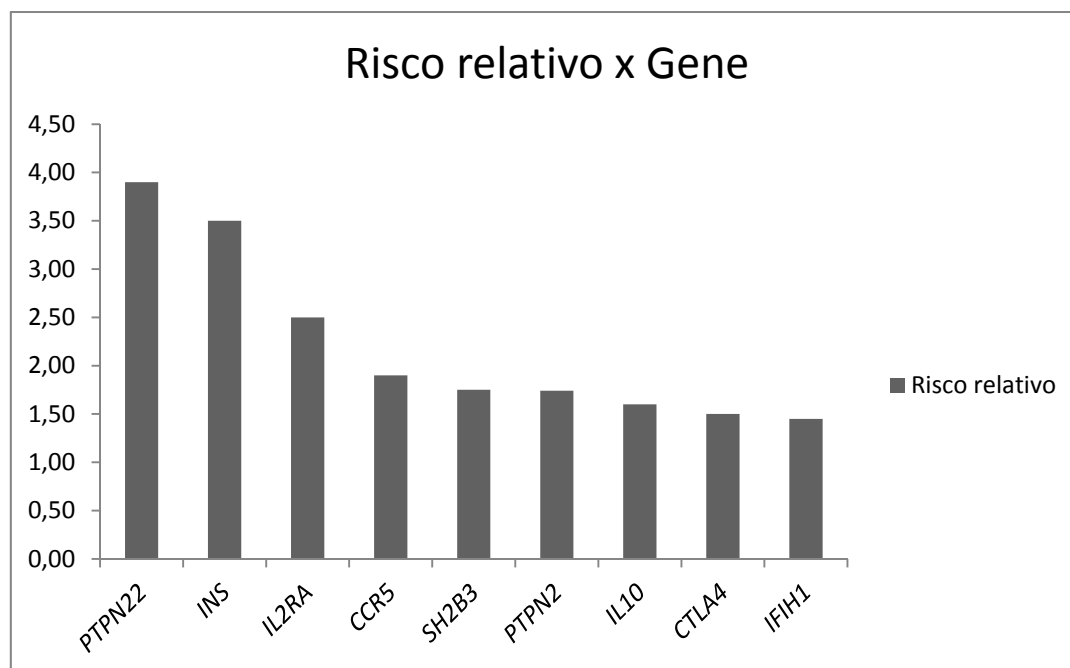
A causa do alto impacto de polimorfismos do *locus* HLA se dá pela sua relação com a resposta imunológica observada na DM1. Alelos do MHC classe II presentes nos linfócitos T CD4⁺ são importantes no reconhecimento de epítomos antigênicos específicos, iniciando a resposta autoimune, enquanto que alelos do MHC classe I desempenham um papel na sinalização das células β que serão destruídas pelas células CD8⁺ na fase efetora da doença (TAIT et al., 2003).

2.4.3 Outros genes associados com a DM1

Além do HLA, polimorfismos em vários outros genes e regiões cromossômicas relacionados com o sistema imune vem sendo identificados como genes associados com a DM1 (Figura 4). Dentre esses, pode-se citar o gene *PTPN22*, que codifica a proteína tirosino-fosfatase não receptora tipo 22 (linfóide), importante na sinalização de células T (BURN, et al., 2011) e gene *CTLA4* (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico), que atua como um co-receptor na ativação de células T CD8⁺ (FIFE;

BLUESTONE, 2008). Polimorfismos nesses genes já foram associados não só com a DM1, mas também com outras doenças autoimunes, como a tireoidite autoimune, artrite reumatóide, doença de Chron e lupus eritematoso sistêmico (ZHERNAKOVA et al., 2009).

Figura 4. Gráfico indicando o risco relativo dos principais *loci* não-HLA envolvidos na diabetes mellitus tipo 1.



Adaptado de Todd (2010).

Outros genes associados com a sinalização, ativação e regulação de células do sistema imune, como *IL2RA*, *CCR5*, *SH2B3*, *PTPN2*, *IL10* e *IFIH1* também vem sendo estudados demonstrando o amplo espectro genético relacionados com a DM1 (LEHNE et al., 2011; STECK; REWERS, 2011).

2.5 FATORES AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA DM1

A seguir são relacionados os diversos fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento da DM1.

2.5.1 Infecções virais

Dentre os fatores ambientais envolvidos no desenvolvimento da DM1, infecções por certos tipos de vírus são consideradas um dos principais fatores associados à doença (HYÖTY; TAYLOR, 2002). Algumas revisões tem ressaltado o papel das infecções virais no desenvolvimento da DM1 (JUN; YOON, 2001; VAN DER WERF et al., 2007). O relato mais antigo data de 1926, e tenta associar variações sazonais de incidência da DM1 com infecções virais (ADAMS, 1926). Dentre os tipos virais estudados, atualmente os Enterovirus são os principais candidatos a uma associação com a DM1, principalmente os Coxsackievirus (Tabela 1) (VAN BELLE et al., 2011).

Tabela 1. Grupos virais associados com a diabetes mellitus tipo 1.

Enterovirus	Coxsackievirus das linhagens A.
	Todos os seis tipos de Coxsackievirus das linhagens B, especialmente os B4 associados com a autoimunidade. Isolados virais induziram diabetes em camundongos.
	Ecovírus. Muitos tipos podem estar envolvidos.
Rubeola	Seguido de infecção intrauterina. A diabetes pode aparecer após um longo intervalo de tempo. Induz anticorpos às células das ilhotas. Vacinação tem atenuado o risco.
Citomegalovirus	Pode ter um pequeno papel na patogênese. Reação cruzada com o epítipo GAD 65.
Vírus Epstein-Barr	Vírus associados com doenças autoimunes, ocasionalmente com a diabetes.
Vírus da caxumba	Muitos relatos antigos, mas nenhum confirmado. A vacinação tem atenuado os riscos.
Retrovirus	Evidências controversas para humanos.
Rotavirus	Relatos de autoimunidade às células da ilhota em uma criança depois da infecção.

adaptado de Hyöty e Taylor (2002).

Em uma revisão, Van der Werf e colaboradores (2007) relacionam seis diferentes vias pelas quais infecções virais podem levar à DM1:

- 1 Infecções virais nas células β podem levar à citólise dessas células;
- 2 As infecções nas células β podem levar à quebra da autotolerância à essas células por conta da expressão de antígenos virais, antígenos das células β alterados e aumento da expressão do MHC, citocinas e quimiocinas.

- 3 Indução da ativação *bystander* de linfócitos T, incluindo linfócitos autorreativos, que agem contra antígenos das células β .
- 4 Expressão de proteínas virais que agem como super antígenos, levando a proliferação de células T específicas;
- 5 Epitopos virais podem apresentar mimicidade molecular com auto-antígenos de células β , levando à ativação cruzada de linfócitos B e T autorreativos.
- 6 Sucessivas infecções podem culminar na autoimunidade das células β .

2.5.1.1 Infecções por enterovírus

Enterovirus são pequenos vírus não-envelopados que possuem um capsídeo icosaédrico e uma molécula de RNA fita simples positiva, linear e não-fragmentada, protegida por uma proteína genômica viral (PGV) na extremidade 5' (JAÏDANE; HOBBER, 2008). Seu genoma corresponde a uma sequência de 7500 bases, e compreende uma única região aberta à leitura (*Open Reading Frame*) ocupando aproximadamente 80% do RNA viral e produzindo uma poliproteína com 2200 aminoácidos que sofre sucessivas clivagens para produzir 11 proteínas maduras, das quais quatro são estruturais (VP1 até VP4) e sete são funcionais. Essa poliproteína é flanqueada por duas regiões não-codificantes que são essenciais para a tradução e síntese do RNA viral (KITAMURA et al., 1981).

A distribuição do Enterovírus é ubíqua, sendo transmitidos principalmente pela água ou comida contaminada com fezes. Além da DM1, a infecção por Enterovírus tem sido relacionada tanto a manifestações agudas, tais como meningite, encefalite e pericardite, quanto à doenças crônicas como por exemplo, meningocefalite em pacientes agamaglobulinêmicos, síndrome pós-poliomielite, esclerose amiotrófica lateral, miocardite crônica e cardiomiopatia dilatada (JAÏDANE; HOBBER, 2008).

O primeiro relato sobre a associação de um Enterovirus com a DM1 foi observado por Gamble e colaboradores (1969), que relataram anticorpos neutralizantes para o Coxsackievirus no soro de pacientes recentemente diagnosticados com DM1 em comparação com controles saudáveis. Posteriormente, esses dados foram confirmados a partir de amplificações por PCR (CLEMENTS et al., 1995). Em um estudo na década de 1970, observou-se que a incidência de casos de pacientes que desenvolveram DM1 após serem infectados pelo Coxsackievirus B4

(CVB4) em relação àqueles que desenvolveram a doença, porém não foram infectados, foi considerada semelhante, sugerindo nenhuma ligação de infecção pelo CVB4 e a DM1 (DIPPE, et al., 1975). Esses resultados indicam que é necessário mais que a infecção viral para se desenvolver a DM1, ressaltando a importância do estudo de fatores genéticos envolvidos com a doença. Trabalhos mais recentes continuam propondo associação entre a infecção por Enterovírus e a DM1 (LÖNNROT et al., 2000; SALMINEN et al., 2003; SCHULTE et al., 2010).

As causas pelas quais a infecção pelo CVB4 leva à DM1 são comumente estudadas em modelos *in vitro*. As linhagens diabetogênicas CVB4 E2 e CVB4 VD2921 podem infectar e causar danos às células β , causando a expressão de moléculas do MHC, que facilitam a resposta autoimune às células infectadas (PARKKONEN et al., 1992). A perturbação da seleção de timócitos pelo sistema de autotolerância no timo devido à infecção pelo CVB4 também pode levar à autoimunidade às células β (BRILOT et al., 2004).

Muitos estudos ainda são necessários para elucidar a associação não só dos Enterovírus, mas também da infecção por outros tipos virais com a precipitação da DM1, auxiliando na elaboração de estratégias preventivas para impedir a patogênese da doença.

2.5.2 Outros fatores ambientais

A seguir, outros fatores, além de infecções virais, que possivelmente estão associados com o desenvolvimento da DM1.

2.5.2.1 Infecções bacterianas

A microbiota intestinal é um dos fatores que podem estar associados ao desenvolvimento da DM1. De um modo geral, a administração de probióticos e antibióticos podem influenciar no desenvolvimento da DM1 por alterar o equilíbrio da microbiota intestinal, tanto em um estado tolerogênico, quanto em um estado não-tolerogênico, dependendo da constituição da microbiota no momento da administração dessas substâncias (BACH, 2002).

Estudos realizados com roedores indicam que há um agravamento da DM1 por conta de desequilíbrios na composição da microbiota intestinal, que fazem com que a permeabilidade intestinal aos patógenos seja diminuída em indivíduos diabéticos, aumentando a exposição de antígenos bacterianos ao sistema imune em uma condição chamada de “intestino mal-vedado” (BACH, 2002; VAARALA et al., 2008). O uso de probióticos específicos podem prevenir a autoimunidade sob certas condições (CALCINARO et al., 2005). Entretanto, outros testes ainda são necessários para comprovar essa observação.

2.5.2.2 Proteínas do leite de vaca

A albumina do leite da vaca tem sido proposta com um fator promotor de autoimunidade por conta de sua atividade cruzada entre anticorpos séricos para a albumina e uma proteína de superfície das células β chamada ICA-1 (BRUSKO; BLUESTONE, 2008). Essa associação ainda permanece bastante controversa por conta de divergentes resultados de experimentos envolvendo modelos de ratos e camundongos diabéticos não-obesos (NOD) comentados em algumas revisões (AKERBLOM et al., 2002; VAN BELLE et al., 2011).

A evidência mais forte sobre o efeito do leite de vaca na autoimunidade foi a associação inversa encontrada entre o período de aleitamento materno e as chances de se desenvolver a DM1 na infância (AKERBLOM et al., 2002), ou seja, crianças que tiveram o aleitamento materno substituído pela ingestão do leite de vaca tem maiores chances de desenvolver a doença. Um estudo Finlandês indicou que a autoimunidade desenvolvida por conta da ingestão de leite de vaca se dá apenas quando os indivíduos apresentam um polimorfismo no gene PTPN22 (C858T), sugerindo esse fator genético como uma das causas das controvérsias entre os resultados (LEIMPAINEN et al., 2009).

2.5.2.3 Proteínas do trigo

De forma semelhante à albumina no leite da vaca, proteínas encontradas no trigo também podem desempenhar um papel no desenvolvimento da DM1. A adição de gliadina, a proteína extraída do glúten do trigo, ou o glúten à dieta tem mostrado

um aumento na incidência de DM1 em modelos de roedores (Macfarlane, et al., 2003). É provável que esse efeito se dê por conta do aumento da atividade das células T quando expostas ao glúten (AKERBLOM et al., 2002).

2.5.2.4 Vitamina D

A vitamina D inibe a diferenciação de células dendríticas e ativação do sistema imune (VAN BELLE et al., 2011). Níveis de metabólitos de vitamina D foram menores no plasma de indivíduos com DM1 na fase inicial da doença (LITTORIN et al., 2006). Estudos de associação genética concluíram sobre a não-associação de polimorfismos no receptor da vitamina D e a DM1, porém polimorfismos em enzimas que participam da via de metabolização da vitamina D podem estar envolvidos com a doença (GUO et al., 2006; BAILEY et al., 2007).

2.6 IFIH1: CARACTERÍSTICAS DO GENE DE SEU PAPEL NA IMUNIDADE INATA

Nas próximas seções será descrita a estrutura gênica e protéica o *IFIH1* e seu papel na imunidade inata.

2.6.1 Características do gene e da proteína

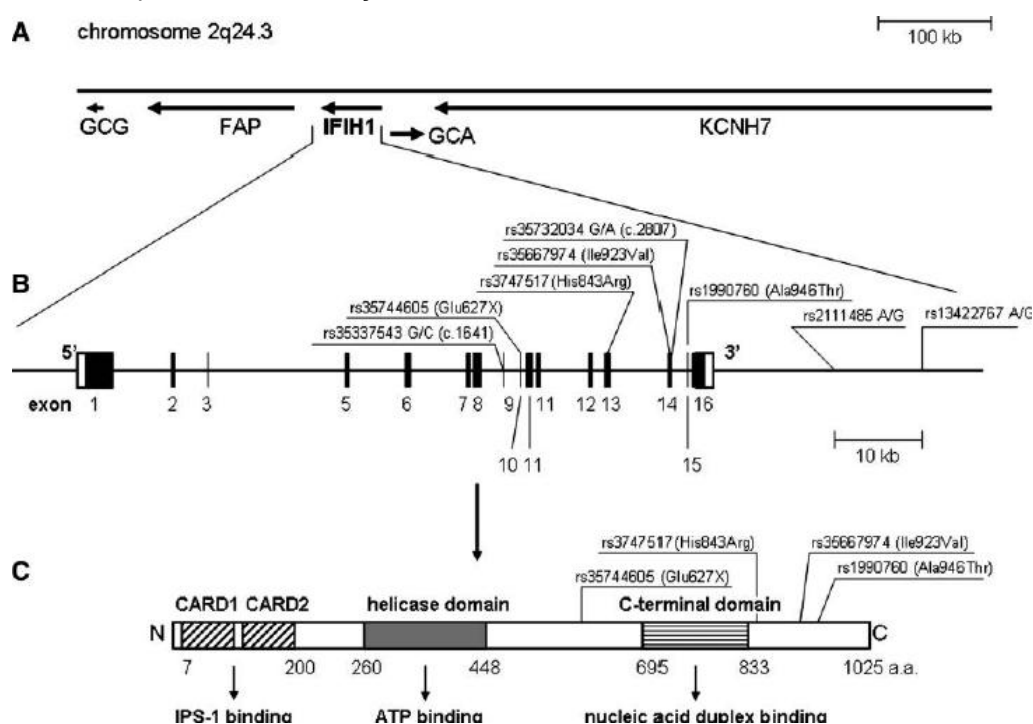
O gene *IFIH1* (Helicase C domínio 1 indutora de interferon tipo 1) – também conhecido como Melanoma Differentiation associated protein number 5 (*MDA5*) – tem tamanho de aproximadamente 51,5 Kb e está localizado no braço longo do cromossomo 2 na região 24 (2q24). Outros genes que estão presentes nessa região cromossômica estão altamente ligados ao *IFIH1*: *FAP*, *GCA* e *KCNH7* (MARTÍNEZ et al., 2008). O *IFIH1* possui 16 éxons e não possui variantes devido à recomposição alternativa. Um cDNA completo do *IFIH1* foi obtido pela primeira vez de uma biblioteca de cDNA placentário humano (KANG et al., 2002). A região codificante do *IFIH1* possui 3365 pb de comprimento, e codifica para 1025 aminoácidos, produzindo uma molécula com peso aproximado de 116,7 KDa (CHISTIYAKOV, 2010) (Figura 5).

Várias mutações de base única (SNPs) no *IFIH1* tem sido associadas à etiologia de doenças autoimunes, como a Artrite Reumatóide (AR) (MARINOU et al.,

2007), Esclerose múltipla (EM) (ENEVOLD et al., 2009), Lupus eritematoso sistêmico (LES) (GRAHAM et al., 2011), Psoríase (LI et al., 2010) e DM1 (SMYTH et al., 2006; TODD et al., 2008; NEJENTSEV et al., 2009). No capítulo seguinte, será dada ênfase aos SNPs associados ao DM1 bem como alguns estudos funcionais relacionados.

A proteína homônima codificada pelo gene *IFIH1* (também conhecida com MDA-5 e Helicard) contém dois domínios altamente conservados: Um domínio N-terminal de recrutamento de caspase (CARD), e um domínio C-terminal contendo uma RNA helicase DExH=D (KANG et al., 2002). O domínio DExH=D é responsável pelo reconhecimento RNA fita dupla dos vírus, enquanto que o domínio CARD é responsável por ativar a cascata de reações que levam à produção de interferon tipo 1 (IFN- α e IFN- β) (TAKEUCHI; AKIRA, 2008).

Figura 5. Distribuição dos polimorfismos de base única (SNPs) no gene *IFIH1* mais estudados na diabetes mellitus tipo 1 e outras doenças autoimunes.



Fonte: CHISTIYAKOV, 2010.

2.6.2 O Papel da IFIH1 na imunidade contra infecções virais

O RNA de fita dupla (dsRNA) representa um intermediário molecular de muitas infecções virais, e portanto, foi necessário que fosse desenvolvido no hospedeiro mecanismos para detectar sua presença (CHISTIYAKOV, 2010).

Atualmente, sabe-se que existem duas vias de reconhecimento e sinalização do dsRNA viral: a via dependente da proteína quinase R (PKR) e a via da 20-50-oligoadenilato sintetase. A PKR é uma quinase induzida por interferon (IFN), que é ativada a partir de sua ligação ao dsRNA citoplasmático, resultando na fosforilação do Fator de iniciação de tradução tipo A (MEURS et al., 1990), inibindo a tradução e replicação viral na célula infectada (WILLIAMS, 2001).

A 20-50-oligoadenilato sintetase é uma enzima que ativa a endoribonuclease RNase L pela síntese de curtos oligoadenilatos, promovendo a clivagem de RNAs viral e celular (CHISTIakov, 2010).

Vale frisar que como ambas as vias são principalmente induzidas por INF e não são necessitadas para a produção desta citocina, outro mecanismo celular é necessário para explicar a relação entre o reconhecimento do dsRNA e a produção de INF do tipo 1 (CHISTIakov, 2010). Tais mecanismos são àqueles mediados por receptores toll-like (TLRs), e àqueles de RNA helicases contendo DExD-H Box. O primeiro mecanismo não será abordado nesse estudo, entretanto, descreveremos o segundo, cuja a IFIH1 faz parte.

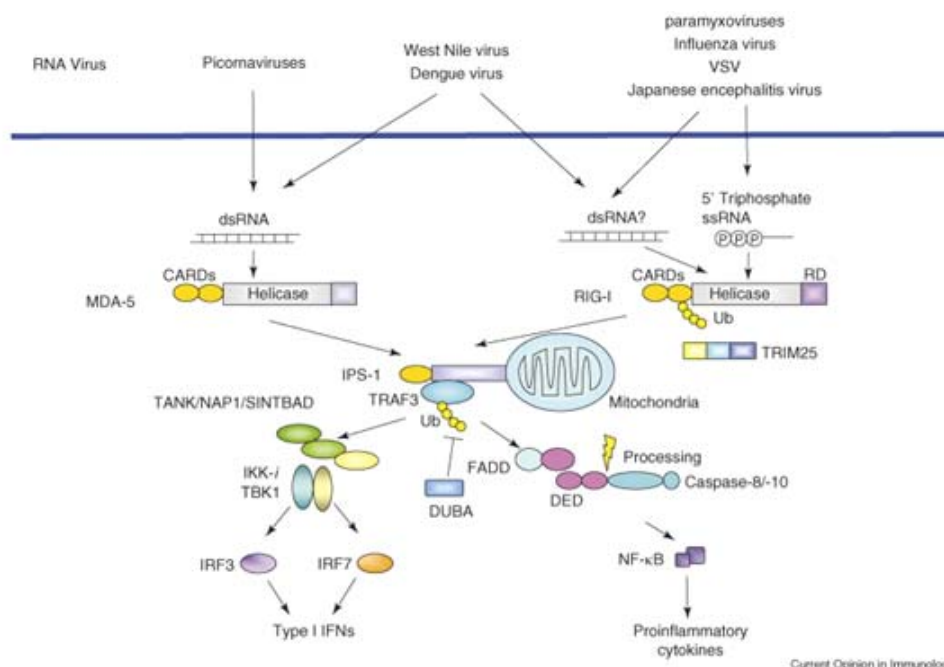
A família das RNA helicases contendo DExD-H Box é constituída pela IFIH1, RIG-I e LGP2, que são RNA helicases induzidas em nível transcripcional por IFNs tipo 1, ácido retinóico e dsRNA. O motivo CARD da RIG-I e da IFIH1 ativam a cascata de sinalização, utilizando uma proteína adaptadora chamada Estimulador do promotor de IFN- β tipo 1 (IPS-1), que resulta na ativação dos fatores regulatórios de interferon (IRF-3), IRF-7 e do NF- κ B (KAWAI et al., 2005). Os interferons induzem apoptose de células infectadas por vírus, bem como ativação de células NK e T (TAKEUCHI; AKIRA, 2008).

A IFIH1 (ou a RIG-I) reconhece a região 5' do dsRNA viral, que não é metilada, diferentemente do RNA celular, por meio do domínio DExD-H Box; a seguir ocorre a interação da IFIH1 com o IPS-1 através do domínio CARD. A ubiquitina ligase E3, conhecida como TRAF3 é necessária para a ativação da sinalização do IPS-1. A desubiquitinase DUBA é responsável por inibir a atividade da TRAF3, suprimindo a sinalização. A TRAF3 recruta duas quinases, TBK1/IKK-i, que fosforilam o IRF-3 e o IRF-7, o que induz a formação de homodímeros e/ou heterodímeros dessas moléculas. Esses dímeros se translocam para o núcleo, se ligando aos elementos responsivos estimulados por IFN, resultando na produção de IFN tipo 1 e genes

associados que também são induzidos por IFN tipo 1 (TAKEUCHI; AKIRA, 2008) (Figura 6).

A IFIH1 compartilha alta similaridade com a RIG-1, porém suas funções não são plenamente similares, como se pensava anteriormente (YONEYAMA et al., 2005). A partir de estudos com camundongos *knockout*, foi observado que cada helicase reconhece grupos virais diferentes, ou ainda, alguns grupos em comum. A RIG-I reconhece tipos virais como o paramixovírus, vírus da estomatite vesicular (VSV) e o vírus influenza (KATO et al., 2006). A IFIH1 reconhece grupos de picornavírus, como o ecovírus, rinovírus e o vírus da encefalomiocardite (ECMCV) (BARRAL et al., 2007). Estudos com RNA silenciador (siRNA) sugerem que ambos RIG-I e IFIH1 compartilham o reconhecimento do vírus da dengue e o vírus do Oeste do Nilo (TAKEUCHI; AKIRA, 2008). Por fim, através de experimentos com o VSV em camundongos *knockout*, acredita-se que a LGP2 esteja associada com a regulação da atividade da RIG-I, desempenhando um papel antagônico (TAKEUCHI; AKIRA, 2008).

Figura 6. Esquema funcional da via de detecção de RNA através de receptores *RIG-I-like*.



Fonte: TAKEUCHI; AKIRA, 2008.

2.6.3 IFIH1 e a Diabetes mellitus tipo 1

Como observamos anteriormente, alguns vírus, em especial aqueles do grupo dos Enterovírus, infectam vários órgãos causando várias perturbações, tais como danos às células- β do pâncreas (VON HERRATH, 2009). Geralmente, essas infecções *per se* não causam a DM1, como foi notado em alguns casos tanto em camundongos quanto em humanos (JUN; YOON, 2001). Entretanto, elas podem contribuir para o quadro de autoimunidade contra as células- β possivelmente por conta do aumento da expressão de fatores inflamatórios como a interleucina 2 (IL-2) e IFN- α , além do MHC-I (VAN DER WERF et al., 2007; VON HERRATH, 2009).

Como foi explicado antes, a IFIH1 desempenha um importante papel na estimulação de interferons tipo 1 em resposta a infecções de certos vírus, principalmente os Enterovírus. Portanto, polimorfismos no gene *IFIH1* podem indiretamente alterar os níveis de IFN tipo 1 nas células, agravando o estado de autoimunidade, levando a DM 1 (LI et al., 2008).

2.6.3.1 Polimorfismos do gene IFIH1 relacionados com a DM1

O primeiro trabalho que relacionou polimorfismos no gene *IFIH1* com a DM1 foi realizado por Smyth e colaboradores (2006) em uma população caucasiana do Reino Unido, que reuniu cerca de 10 mil indivíduos. Nesse estudo de associação genômica, o SNP rs1990760 (A946T), uma substituição não sinônima no éxon 14, onde se encontra o sítio de ligação do fator de transcrição HNF-3b, mostrou-se associada à DM1 com um efeito protetor (OR = 0.86; P = 1.42×10^{-10}) para o alelo mutante. Em um estudo funcional (SHIGEMOTO, et al., 2009) não foi observada mudança no fenótipo do alelo mutante para o alelo selvagem. Além disso, outros dois estudos (DOWNES et al., 2010; ZOUK et al., 2010) não encontraram mudanças nos níveis de expressão da IFIH1 relacionadas com a mutação A946T. Portanto, o papel protetor do SNP rs1990760 contra a DM1 ainda permanece inconclusivo.

Posteriormente ao trabalho de Smyth e colaboradores, outro estudo de associação genômica (NEJENTSEV et al., 2009), identificou quatro variantes raras no gene IFIH1 altamente relacionadas com a proteção a DM1: a mutação de perda de função G627X (rs35744605) no éxon 10, as mutações 1641+1 (G/C) (rs35337543) e

2807+1 (G/A) (rs35732034), que alteram o sítio de *splicing* nos íntrons 8 e 14, respectivamente, e finalmente a mudança não-sinônima I923V (rs35667974) no éxon 14. As *odds ratios* (OR) variaram entre 0,51 e 0,74. Esse último também foi estudado em pacientes com EM, porém não foi observada associação (BERGAMASCHI et al., 2010).

Downes e colaboradores (2010) estudaram a expressão de indivíduos portadores dessas raras variantes e observou que os níveis de IFIH1 foram menores para os portadores da mutação de perda de função G627X. Para a mudança não-sinônima I923V, observou-se que o nível de expressão não foi reduzido, porém a eficiência da IFIH1 foi reduzida. Acredita-se que essa perda de eficiência se dá por mudanças na interação entre a IFIH1 e o IPS-1 (DOWNES et al., 2010). Com relação às duas variantes nos íntrons 8 e 14, foi observada menor quantidade de mRNA transcrito nos portadores das mutações, indicando a produção de uma proteína aberrante.

Outro SNP associado com a proteção a DM1 é o rs3747517 (H843A) localizado no éxon 13 em um sítio de ligação do regulador de transcrição AP-1 (LIU et al., 2009), e seu efeito pode estar relacionado com a diminuição de transcrição do gene (DOWNES et al., 2010).

Por fim, outros dois SNPs associados com a DM1 é o rs2111485 (A/G) e o rs13422767 (A/G), que estão localizados entre o gene *FAP* e o *IFIH1* (a 13 Kb e 23 Kb do fim do IFIH1, respectivamente), onde foram observadas OR de 1,7 e 1,9 (LIU et al., 2009). Ainda não há estudos quanto a sua funcionalidade desses dois SNPs, uma vez que eles não alteram o sítio de ligação de nenhum fator de transcrição conhecido.

2.6.4 Polimorfismos no gene IFIH1 estudados em outras doenças autoimunes e infecciosas

Além da DM1, alguns SNPs do gene *IFIH1* também se mostrou associado a outras doenças autoimunes. LI e colaboradores (2010) observaram um efeito protetor dos SNPs rs35667974 e rs10930046 contra a psoríase. Outro polimorfismo estudado para a psoríase foi o rs17716942, que não demonstrou associação com a doença (CHEN et al., 2011). Ainda com relação ao SNP rs10930046, ENEVOLD et al. (2009)

realizaram um estudo com esclerose múltipla que não revelou associação deste polimorfismo com a doença. Molineros e colaboradores (2013) observaram associação desse SNP com o LES e de uma variante intrônica (rs13023380).

Outros dois polimorfismos estudados por Enevold e colaboradores em pacientes com EM foram o rs3747517 e o rs1990760, onde foi encontrada uma associação desses polimorfismos com a proteção ao desenvolvimento da doença. Entretanto, um estudo anterior não havia encontrado associação do SNP rs1990760 com essa doença (MARTÍNEZ et al., 2008). Esses mesmos dois SNPs foram estudados por Chen e colaboradores (2011) onde os autores observaram respectivas associações de proteção e susceptibilidade com a periodontite crônica, além de um efeito protetor do SNP rs1990760 ao desenvolvimento da psoríase, indicando que o mesmo polimorfismo pode produzir efeitos opostos em diferentes doenças.

Além das doenças acima citadas, o polimorfismo rs1990760 dentre outros também estão possivelmente associado com a susceptibilidade ao LES (GRAHAM et al., 2011; CEN et al., 2012; MOLINEROS et al., 2013; WANG et al., 2013), doença de Graves (SUTHERLAND et al., 2007, ZURAWK et al., 2013) e vitiligo (JIN et al., 2012). Entretanto, com relação à Doença de Graves, Penna-Martinez e colaboradores (2009), em outro estudo, não encontraram associação desse polimorfismo com a doença, assim como também não encontraram associação com a tireoidite de Hashimoto nem com a Doença de Addison, sendo essa última já estudada por Sutherland e colaboradores (2007), que encontrou resultados similares. Marinou e colaboradores (2007) e Smyth e colaboradores (2008) estudaram o SNP rs1990760 em pacientes com artrite reumatoide e doença celíaca, respectivamente, e não encontraram associação.

3 OBJETIVOS

Abaixo determinamos os objetivos gerais do trabalho e pontuamos os objetivos específicos.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar a influência de polimorfismos no gene *IFIH1* no desenvolvimento de doenças autoimunes, principalmente a diabetes mellitus tipo 1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas de variantes do gene *IFIH1* em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 em Pernambuco e de uma população saudável do mesmo local;
- Verificar a associação dessas variantes com um possível efeito de risco ou proteção ao desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 1;
- Avaliar a associação das variantes do *IFIH1* com a susceptibilidade ou proteção à outras doenças autoimunes.

4 MÉTODOS

Informações detalhadas sobre os indivíduos selecionados para essa pesquisa, bem como os materiais e os métodos empregados, estão relacionados nos apêndices A e B.

5 RESULTADOS

Todos os resultados obtidos no presente trabalho estão detalhados nos apêndices A e B.

6 DISCUSSÃO

Considerando o papel das infecções virais na etiologia da Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), doença autoimune da tireóide (DAIT) e doença celíaca (DC) mecanismos deficientes no reconhecimento viral causados por uma molécula de IFIH1 deficiente podem estar associados com o desenvolvimento destas doenças (KNIP et al., 2005; DESAILLOUD; HOBBER, 2009). De fato, Smyth e colaboradores. (2006) encontraram associação do SNP rs1990760 (A946T), mas Penna-Martínez e colaboradores (2009) não encontraram associação deste polimorfismo com a doença de Graves e a tireoidite de Hashimoto. Assim como na DAIT, Smyth e Colaboradores (2008) não encontraram associação envolvendo a DC e o *IFIH1*.

O primeiro estudo realizado (apêndice A) nesse projeto reporta uma tendência para associação do tag-SNP rs6432714 com a susceptibilidade à DM1, considerando o modelo de semidominância. Esse tag-SNP representa a região entre os íntrons 6 e 7, apresentando alto desequilíbrio de ligação com os outros SNPs desse fragmento, e dentre eles, o SNP não sinônimo rs10930046. Entretanto, nossos dados não sugerem uma relação da variante rs10930046 com a DM1.

O polimorfismo rs10930046 consiste em uma alteração do aminoácido na posição 460 (histidina) por um resíduo de arginina (H460R), ambos carregados positivamente, em uma região de alfa-hélice do domínio helicase, que é responsável pelo reconhecimento de dsRNA viral (VASSEUR et al., 2011).

De acordo com os nossos dados de modelagem molecular, a variação estrutural observada não parece ser suficiente para causar uma deficiência na detecção do dsRNA do vírus através da proteína que afete a susceptibilidade à DM1 ou a insurgência de DAIT e DC, corroborando com os resultados descritos por Shigemoto e colaboradores (2009).

No trabalho apresentado no apêndice B, relatamos um estudo envolvendo polimorfismos do gene *STAT4* (rs7574865 e rs3024839) e do *IFIH1* (rs3747517 e rs1990760). Ambos os genes codificam para proteínas que fazem parte de uma das vias de ativação do Interferon tipo I (ZHENG et al., 2013). Nesse estudo, não foi observada associação de ambos os SNPs do *IFIH1* com o desenvolvimento da DM1 ou da síndrome autoimune poliglandular tipo III, que é a co-ocorrência da DAIT e DM1 (DITTMAR; KAHALY, 2010).

Entretanto, a meta-análise realizada com grande parte dos estudos envolvendo o SNP rs1990760 e a DM1, incluindo o nosso, foi observada associação desse polimorfismo com a DM1. Essa meta-análise reforça outra meta-análise já realizada anteriormente (JERMENDY et al., 2009), porém agora com o acréscimo de novos trabalhos publicados.

Apesar de vários trabalhos apontarem a associação da variante não sinônima rs1990760 (A946T) com a DM1 e da expressão ser afetada (LIU et al., 2009), estudos funcionais não conseguiram determinar o efeito biológico dessa variação tanto em pacientes saudáveis, quanto em pacientes com DM1 (SHIGEMOTO et al., 2009; DOWNES et al., 2010, ZOUK et al., 2013).

É possível que o SNP rs3747517 (A843H) seja o real fator associado com a susceptibilidade à DM1 (DOWNES et al., 2010), mas apesar de se saber que esse polimorfismo está localizado em uma região da proteína importante no reconhecimento do dsRNA (WU et al., 2012), ainda não foram feitos estudos funcionais suficientes para comprovar essa hipótese.

Em nossos dois estudos os resultados não indicam uma evidência forte do gene *IFIH1* como fator relacionado com a DM1. Sendo assim, algumas considerações sobre os estudos devem ser feitas: o tamanho amostral dos estudos é baixo; fatores de confundimento podem estar interferindo nos resultados.

No primeiro estudo, o poder estatístico para excluir a possibilidade de um falso negativo foi alto (maior que 0,80). O mesmo não foi observado no segundo estudo em que o poder estatístico foi inferior a 0,80. Ainda no segundo estudo, a meta-análise envolvendo o SNP rs1990760 detectou certa heterogeneidade entre os estudos. Essa heterogeneidade pode estar relacionada com diferentes graus de estruturação populacional observados nas populações estudadas.

De fato, estudos de genética de população apontam frequências de alguns SNPs do *IFIH1* diferentes entre populações com alto grau de miscigenação em relação a populações com baixo grau de miscigenação (FUMAGALLI et al., 2011), o que não foi considerado em nossos trabalhos.

Portanto, outros estudos mais robustos e que levem em consideração a estruturação populacional como fator de confundimento são necessários para determinar o papel do *IFIH1* na DM1.

7 CONCLUSÕES

Nossos achados indicam que o tag-SNP rs6432714 do gene *IFIH1* apresentou tendência para associação com a diabetes mellitus tipo 1; o SNP rs10930046 (H460R), que é representado por esse tag-SNP não apresentou associação com DM1 ou outras doenças autoimunes, porém uma análise *in silico* indica que essa variação produz uma alteração na estabilidade da proteína; Os polimorfismos rs3747517 (H843R) e rs1990760 (A946T) também não apresentaram associação com o desenvolvimento da DM1 ou síndrome poliglandular autoimune tipo III; entretanto, a meta-análise envolvendo o rs1990760 confirmou resultados anteriores de que esse SNP está associado com a DM1; O poder estatístico reduzido em alguns testes e a estratificação populacional podem ser fatores que contribuíram para que o presente estudo tenha produzido resultados divergentes dos já observados na literatura.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. F. The seasonal variation in the incidence of acute diabetes. **Arch Int Med**, v. 37, p. 861, 1926.
- AKERBLOM, H. K. et al. Environmental Factors in the Etiology of Type 1 Diabetes. **Am J Med Genet**, v. 115, p. 18-29, 2002.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, p. 221-229, 2001.
- BACCHETTA, R. et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1713–1722, 2006.
- BACH, J. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med**, v. 347, n. 12, p. 911-920, 2002.
- BAILEY, R. et al. Association of the Vitamin D Metabolism Gene CYP27B1 With Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 56, p. 2616-2621, 2007.
- BAKER II, P.R.; STECK, A. K. The Past, Present , and Future of Genetic Associations in Type 1. **Diabetes.Curr Diab Rep**, v. 11, p. 445-453, 2011.
- BARRAL, P. M. et al. MDA-5 Is Cleaved in Poliovirus-Infected Cells. **J Virol**, v. 81, n. 8, p. 3677-3684, 2007.
- BENDING, D.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Inflammation and type one diabetes. **Int Immunol**, v. 24, n. 6, p. 339-346, 2012.
- BERGAMASCHI, L. et al.. No evidence of association of the rare nsSNP rs35667974 in IFIH1 with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 221, p. 112-114, 2010.
- BONIFACIO, E. et al. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. **J Immunol**, v. 163, p. 525–532, 1999.
- BRESSON, D. et al. Genetic-induced Variations in the GAD65 T-cell Repertoire Governs Efficacy of Anti-CD3/GAD65 Combination Therapy in New-onset Type 1 Diabetes. **Mol Therap**, v. 18, n. 2, p. 307-316, 2010.
- BRESSON, D. et al. Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recentonset autoimmune diabetes by inducing Tregs. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1371-1381, 2006.
- BRILO, T. F. et al. Coxsackievirus B4 Infection of Human Fetal Thymus Cells. **J virol**, v. 78, n. 18, p. 9854-9861, 2004.
- BRUSKO, T.; BLUESTONE, J. Clinical applications of regulatory T cells transplantation. **Eur J Immunol**, v. 38, p. 901-937, 2008.

- CALCINARO, A. F.; SIMONE, D.; MARIO, D. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. **Diabetologia**, v. 48, p. 1565-1575, 2005.
- CAMARCA, M. E. et al. Celiac disease in type 1 diabetes mellitus. **Ital J Pediatr**, v. 38, p. 10-16, 2012.
- CEN, H. et al. Association Study of IFIH1 rs1990760 Polymorphism with Systemic Lupus Erythematosus in a Chinese Population. **Inflammation**, DOI: 10.1007/s10753-012-9564-0, 2012.
- CHEN, G. et al. Genetic variants in IFIH1 play opposite roles in the pathogenesis of psoriasis and chronic periodontitis. **Int J Immunogenet**, v. 00, p. 1-7, 2011.
- CHISTIakov, D. A. Interferon Induced with Helicase C Domain 1 (IFIH1) and Virus-Induced Autoimmunity: A Review. **Viral Immunol**, v. 23, p. 3-15, 2010.
- CLEMENTS, G. B.; GALBRAITH, D. N.; TAYLOR, K.W. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. **Lancet**, v. 346, p. 221-223, 1995.
- DESAILLOUD, R.; HOBBER, D. Viruses and thyroiditis: an update. **Virology**, v. 6, 2009.
- DIAMOND – DIABETES MONDIALE GROUP. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. **Diabet Med**, v. 23, p. 857-866, 2006.
- DIPPE, S.E. et al Lack of Causal Association Between Coxsackie B4 Virus Infection and Diabetes. **Lancet**, v. 305, n. 7920, p. 1314-1317, 1975.
- DITTMAR, M.; KAHALY, G. J. Genetics of the Autoimmune Polyglandular Syndrome Type 3 Variant. **Thyroid**, v. 20, p. 737-743, 2010.
- DOWNES, K. et al. A. Reduced Expression of IFIH1 Is Protective for Type 1 Diabetes. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. 1-6, 2010.
- EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med**, v. 314, p. 1360-1368, 1986.
- ENEVOLD, C. et al. Multiple sclerosis and polymorphisms of innate pattern recognition receptors. **J Neuroimmunol**, v. 212, p. 125-131, 2009.
- ESPINO-PAISÁN, L.; URCELAY, E.; SANTIAGO, J. L. An insight into the genetics of type 1 Diabetes. **Immunologia**, v. 28, p. 173-181, 2009.
- EURODIAB, ACE STUDY GROUP. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. **Lancet**, v. 355, p. 873-876, 2000.
- FIFE, B.T.; BLUESTONE, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. **Immunol Rev**, v. 224, p.166-182, 2008.

FUMAGALLI, M. et al. Population Genetics of IFIH1: Ancient Population Structure, Local Selection, and Implications for Susceptibility to Type 1 Diabetes. **Mol. Biol. Evol.**, v. 27, n. 11, p. 2555-2566, 2011.

GAMBLE, D. R. et al. Viral Antibodies in Diabetes Mellitus. **Brit Med J**, v. 3, p. 627-630, 1969.

GAN, M. J.; ALBANESE-O'NEIL, A.; HALLER, M. J. Type 1 Diabetes: Current Concepts in Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Care, and Research. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, v. 42, p. 269-291, 2012.

GRAHAM, D. S. C. et al. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. **PLoS Genet**, v. 7, n. 10, 2011.

GUO, S. et al. Meta-Analysis of Vitamin D Receptor Polymorphisms and Type 1 Diabetes: A HuGE Review of Genetic Association Studies. **Am J Epidemiol**, v. 164, n. 8, p. 711-724, 2006.

HYÖTY, H.; TAYLOR, K. W. The role of viruses in human diabetes. **Diabetologia**, v. 45, p. 1353-1361, 2002.

JAÏDANE, H.; HOBBER, D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. **Diabet Metabol**, v. 34, p. 537-548, 2008.

JERMENDY, A. et al. The interferon-induced helicase IFIH1 Ala946Thr polymorphism is associated with type 1 diabetes in both the high-incidence Finnish and the medium-incidence Hungarian populations. **Diabetologia**, v. 53, p. 98-102, 2009.

JIN, Y. et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. **Nat Genet**, v. 44, n. 6, p. 676-681, 2012.

JUN, H. S.; YOON, J. W. The role of viruses in Type I diabetes : two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. **Diabetologia**, v. 44, p. 271-285, 2001.

KAHALY, G. J. Polyglandular autoimmune syndromes. **Eur J Endocrinol**, v. 161, p. 11-20, 2009

KANG, D. et al. mda-5 : An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. **PNAS**, v. 99, n. 2, p. 637-642, 2005.

KATO, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature**, v. 441, p. 101-105, 2006.

KAWAI, T. et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. **Nat Immunol**, v. 6, n. 10, p. 981-988, 2005.

KITAMURA, N. et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. **Nature**, v. 291, p. 547-553, 1981.

KNIP, M.; SIMELL, O. Environmental Triggers of Type 1 Diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**, DOI: 10.1101/cshperspect.a007690, 2012.

KNIP, M. et al. Environmental Triggers and Determinants of Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, p. 125-136, 2005.

KYVIK, K. O.; GREEN, A.; BECK-NIELSEN, H. Concordance Rates of Insulin Dependent Diabetes Mellitus: A Population Based Study Of Young Danish Twins. **BMJ**, v. 311, p. 913-917, 1995.

LEHNE, B.; LEWIS, C. M.; SCHLITT, T. From SNPs to Genes: Disease Association at the Gene Level. **PLoS One**, v. 6, n. 6, DOI: 10.1371/journal.pone.0020133, 2001.

LEIMPAINEN, J. et al. Interplay Between PTPN22 C1858T Polymorphism And Cow's Milk Formula Exposure In Type 1 Diabetes. **J Autoimmun**, v. 33, p. 155-164, 2009.

LESLIE, R. D. G.; ATKINSON, M. A.; NOTKINS, A. L. Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. **Diabetologia**, v. 42, p. 3-14, 1999.

LI, Q. et al. Interferon- α initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. **PNAS**, v. 105, n. 34, p. 1-6, 2008.

LI, Y. et al. Carriers of rare missense variants in IFIH1 are protected from psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 12, p. 2768-2772, 2010.

LITTORIN, B. et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects : results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). **Diabetologia**, v. 49, p. 2847-2852, 2006.

LIU, S. et al. IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 2, p. 358-365, 2009.

LÖNNROT, M. et al. Enterovirus Infection as a Risk Factor for β -Cell Autoimmunity in a Prospectively Observed Birth Cohort. **Diabetes**, p. 492-496, 2000.

LUNETTA, K. L. Genetic Association Studies. **J Am Heart Assoc**, v. 118, p. 96-101, 2008.

MACFARLANE, A. J. et al. A type 1 diabetes-related protein from wheat (*Triticum aestivum*). cDNA clone of a wheat storage globulin, Glb1, linked to islet damage. **J Biol Chem**, v. 278, p. 54-63, 2003.

MARINO, I. et al. Research article The interferon induced with helicase domain 1 A946T polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n. 2, p. 1-5, 2007.

MATINÍNEZ, A. et al. IFIH1-GCA-KCNH7 locus: influence on multiple sclerosis risk. **Eur J Hum Genet**, v. 16, p. 861-864, 2008.

MEURS, E. et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. **Cell**, v. 62, p. 379-390, 1990.

MOLINEROS, J. E. et al. Admixture Mapping in Lupus Identifies Multiple Functional Variants within IFIH1 Associated with Apoptosis, Inflammation, and Autoantibody Production. **PLoS Genet**, v. 9, n. 2, e1003222, 2013.

NEJENTSEV, S. et al. Rare Variants of IFIH1, a Gene Implicated in Antiviral Responses, Protect against Type 1 Diabetes. **Science**, v. 324, p. 387-389, 2009.

NOBLE, J. A. et al. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: Molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. **Am J Hum Genet**, v. 59, p. 1134-1148, 1996.

PARKKONEN, P. et al. Mumps virus infects beta cells in human fetal islet cell cultures upregulating the expression of HLA class 1 molecules. **Diabetologia**, v. 35, p. 63-69, 1992.

PATTERSON, C. C. et al. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–2020: a multicentre prospective registration study. **Lancet**, v. 373, p. 2027-2033, 2009.

PENNA-MARTINEZ, M. et al. The rs1990760 polymorphism within the IFIH1 locus is not associated with Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. **BMC Med Genet**, v. 10, 2009.

PINO, S. C.; KRUGER, A. J.; BORTELL, R. The Role of Innate Immune Pathways in Type 1 Diabetes Pathogenesis. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v.17, n. 2, p. 126-130, 2010.

REDONDO, M. J.; FAIN, P. R.; EISENBARTH, G. S.; Genetics of Type 1A Diabetes. **Recent Prog Horm Res**, v. 56, p. 69-89, 2001.

REDONDO, M. J. et al. Concordance for Islet Autoimmunity among Monozygotic Twins. **N Engl J Med**, v. 359, n. 26, p. 2849-2850, 2008.

ROTHER, H. et al. IL-18 Inhibits Diabetes Development in Nonobese Diabetic Mice by Counterregulation of Th1-Dependent Destructive Insulinitis. **J Immunol**, v. 163, p. 1230-1236, 1999.

SALMINEN, K. et al. Enterovirus Infections Are Associated With The Induction Of B-Cell Autoimmunity In A Prospective Birth Cohort Study. **J Med Virol**, v. 69, p. 91-98, 2003.

SCHULTE, B. M. et al. Detection of Enterovirus RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Type 1 Diabetic Patients Beyond the Stage of Acute Infection. **Viral Immunol**, v. 23, n. 1, p. 99-104, 2010.

SHIGEMOTO, T. et al. Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. **J Biol Chem**, v. 284, n. 20, p. 13348-13354, 2009.

SMYTH, D. J. et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. **Nat Genet**, v. 38, p. 617-619, 2006.

SMYTH, D. J. et al. Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease. **N Engl J Med**, v. 359, p. 2767-2777, 2008.

STECK, A.K.; REWERS, M. J. Genetics of Type 1 Diabetes. **Clin Chem**, v. 57, n. 2, p. 176-185, 2011.

STEHNO-BITTEL, L. Organ-Based Response to Exercise in Type 1 Diabetes. **ISRN Endocrinol**, DOI: 10.5402/2012/318194, 2012.

STIPANIC, G. et al. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes in Croatia from 1995 to 2003. **Diab Res Clin Pract**, v. 80, p. 122-127, 2008.

SUAREZ-PINZON, W. L. et al. Combination Therapy With Glucagon-Like Peptide-1 and Gastrin Restores Normoglycemia in Diabetic NOD Mice. **Diabetes**, v. 57, p. 3281-3288, 2008.

SUTHERLAND, A. et al. Genomic Polymorphism at the Interferon-Induced Helicase (IFIH1) Locus Contributes to Graves'. **J Clin Endocr Metab**, v. 92, n. 8, p. 3338-3341, 2007.

SUTHERLAND, A. P. R. et al. Interleukin-21 Is Required for the Development of Type 1 Diabetes in NOD Mice. **Diabetes**, v. 58, p. 1144-1155, 2009.

TAIT, B. D. et al. HLA genes associated with autoimmunity and progression to disease in type 1 diabetes. **Tissue Antigens**, v. 61, p. 146-153, 2003.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. MDA5 / RIG-I and virus recognition. **Curr Opin Immunol**, v. 20, p. 17-22, 2008.

WTCCC – THE WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM. Genome-wide association study of copy number variation in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 713-720, 2010.

TODD, J. A. Etiology of Type 1 Diabetes. **Immunity**, v. 32, p. 457-467, 2010

TODD, J. A. et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. **Nat Genet**, v. 39, n. 7, p. 857-864, 2008.

VAARALA, O.; ATKINSON, M. A.; NEU, J. The “Perfect Storm” For Type 1 Diabetes: The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, And Mucosal Immunity. **Diabetes**, v. 57, p. 2555-2562, 2008.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. **Physiol Rev**, v. 91, p. 79-118, 2011.

VAN DER WERF, N. et al. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 23, p. 169-183, 2007.

VASSEUR, E. et al. The selective footprints of viral pressures at the human RIG-I-like receptor family. **Hum Mol Genet**, v. 20, p. 4462–4474, 2011.

VERGE, C. F. et al. Combined Use of Autoantibodies (IA-2 Autoantibody, GAD Autoantibody, Insulin Autoantibody, Cytoplasmic Islet Cell Antibodies) in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 47, p. 1857-1866, 1998.

VILLANO, M. J. B. et al. Autoimmune Thyroiditis and Diabetes: Dissecting the Joint Genetic Susceptibility in a Large Cohort of Multiplex Families. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 4, p. 1458–1466, 2009.

VILLASEÑOR, J.; BENOIST, C.; MATHIS, D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. **Immunol Rev**, v. 204, p. 156-164, 2005.

VON HERRATH, M. Diabetes: A virus-gene collaboration. **Nature**, v. 459, p. 518-519, 2009.

WANG, C.; et al. Contribution of IKBKE and IFIH1 gene variants to SLE susceptibility. **Genes Immun**, DOI: doi:10.1038/gene.2013.9, 2013.

WILLIAMS, B. R. Signal integration via PKR. **Sci STKE**, v. 2001, n. 89, p. RE2, 2001.

WU, B. et al. Structural Basis for dsRNA Recognition, Filament Formation, and Antiviral Signal Activation by MDA5. **Cell**, v. 152, p. 1-14, 2012.

YONEYAMA, M. et al. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. **J Immunol**, v. 175, p. 2951-2858, 2005.

ZHENG, J. et al. Meta-analysis reveals an association of STAT4 polymorphisms with systemic autoimmune disorders and anti-dsDNA antibody. **Hum Immunol**, v. 74, p. 986-992, 2013.

ZHERNAKOVA, A.; VAN DIEMEN, C. C.; WIJMENGA, C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. **Nat Rev Genet**, v. 10, p. 43-55, 2009.

ZIPRIS D. Epidemiology Of Type 1 Diabetes And What Animal Models Teach Us About The Role Of Viruses In Disease Mechanisms. **Clin Immunol**, v. 131, p. 11-23, 2009.

ZOUK, H.; MARCHAND, L.; POLYCHRONAKOS, C. Study of Transcriptional Effects in *Cis* at the *IFIH1* Locus. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. 3-8, 2010.

ZOUK, H. et al. Functional characterization of the Thr946Ala SNP at the type 1 diabetes *IFIH1* locus. **Autoimmunity**, DOI: 10.3109/08916934.2013.832758, 2013.

ZURAWEK, M. et al. Polymorphisms in the Interferon-Induced Helicase (*IFIH1*) locus and susceptibility to Addison`s disease. **Clin Endocrinol**, v. 78, p. 191-196, 2013.

APÊNDICE A – INTERFERON INDUCED WITH HELICASE C DOMAIN 1 (IFIH1): TRENDS ON HELICASE DOMAIN AND TYPE 1 DIABETES ONSET

Artigo publicado na revista Gene (Índice QUALIS B; Fator de Impacto 2,34)

Autores

Ronald Moura^{a,c}, Jacqueline Araujo^b, Rafael Guimarães^a, Sergio Crovella^{a,c}, Lucas Brandão^{a,d,*}

Filiação:

^aLaboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^bPediatric Endocrinology Service of Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

^cDepartment of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^dDepartment of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

*Autor correspondente. Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária. Zip Code: 50670-901. Recife, Pernambuco, Brazil. Phone: +55 8121268484 and fax: +55 8121268485. www.ufpe.br/like

E-mail address: lucabrand@gmail.com (L. Brandão).



Interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1): Trends on helicase domain and type 1 diabetes onset

Ronald Moura^{a,c}, Jacqueline Araujo^b, Rafael Guimarães^a, Sergio Crovella^{a,c}, Lucas Brandão^{a,d,*}

^a Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Pediatric Endocrinology Service of Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

^c Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

article info

Article history:

Accepted 22 November 2012

Available online 13 December 2012

Keywords:

Enterovirus
response Autoimmune
diseases Genetic
susceptibility
Single nucleotide polymorphism

abstract

The Interferon-induced with helicase C domain 1 (IFIH1) gene has been hypothesized as involved in the viral etiology of type 1 diabetes (T1D) and other autoimmune disorders, since it is implicated in viral recognition. In our study we analyzed IFIH1 rs6432714 and rs10930046 SNPs in T1D patients stratified for the presence of celiac disease and autoimmune thyroid disease. No association with susceptibility to develop the diseases was found. The rs6432714, a tag-SNP that represents part of helicase domain of IFIH1 protein showed a trend of association only with T1D development ($P > 0.025$ after Bonferroni adjustment) in log-additive model (OR = 1.45, $P = 0.0365$, power = 0.99), indicating that helicase domain of IFIH1 protein could be associated with the susceptibility to T1D.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial autoimmune disorder characterized by chronic damage and destruction of beta-cells, at Langerhans islets of the pancreas, with consequent reduction or lack of insulin production (van Belle et al., 2011). The detailed pathogenic mechanisms of T1D remain unclear, but common pathways could be shared between T1D and other disorders, such as celiac disease (CD) and autoimmune thyroid disease (AITD), which lead to insurgescence of two or even three autoimmune diseases simultaneously (Barera et al., 2002; Perros et al., 1995). The genetic profile and environmental factors such as climate differences and increased prevalence of viral infections in children could be involved in the pathogens of these disorders (Zipris, 2009).

Viral infections have been considered as one of the major environmental factors associated with T1D (Hyoty and Taylor, 2002). Many authors are describing how virus infections, mainly Enterovirus,

could trigger T1D (Jun and Yoon, 2001; Salminen et al., 2003; Szopa et al., 1993; van der Werf et al., 2007). Recently IFIH1 gene has been reported as implicated in the viral recognition and T1D development (Todd, 2010).

IFIH1 gene (chromosome 2q24) encodes the Interferon-induced with helicase C domain 1 (IFIH1), and is able to activate type 1 Interferon response and pro-inflammatory cytokines by CARD domains, after the recognition of double strand RNA virus, such as Enterovirus, at the cytoplasm from infected cells (Chistiakov, 2010).

This study aims to evaluate the association between IFIH1 gene rs10930046 and rs6432714 SNPs and T1D as well as the insurgescence of AITD and CD in T1D patients from a Northeastern Brazilian population.

2. Material and methods

We enrolled 196 type 1 diabetes patients (median age 14 ± 4 years) followed up at three public health centers from Recife city, Northeastern of Brazil (Instituto de Medicina Integral de Pernambuco, Hospital da Restauração and Hospital das Clínicas). T1D diagnosis has been made according to American Diabetes Association criteria (American Diabetes Association, 2012). Within the 196 T1D subjects, 10 were also diagnosed with celiac disease (AITD⁺CD⁺), 35 with autoimmune thyroid disease (AITD⁺CD⁻) and 6 with both diseases (AITD⁺CD⁺). The AITD diagnosis was made by Antibodies to thyroperoxidase (Anti-TPO) detection by chemi-luminescence (Immulate anti-TPO Ab, Diagnostic products Co, Los Angeles, USA) following the manufacturer's instructions. For diagnosing CD among the T1D patients, an Anti-transglutaminase antibody (anti-tTg) assay was determined by

Abbreviations: T1D, type 1 diabetes; CD, celiac disease; AITD, autoimmune thyroid disease; IFIH1, Interferon induced with helicase C domain 1; Anti-TPO, thyroperoxidase antibody; Anti-tTg, anti-transglutaminase antibody; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SNP, single nucleotide polymorphism; PCR, polymerase chain reaction; AIC, Akaike's information criterion; OR, odds ratio; CI, confidence interval; RNA, ribonucleic acid; NCBI, National Center for Biotechnology Information; MAF, minor allele frequency; IFN- β , interferon beta.

* Corresponding author at: Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Zip Code: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 8121268484; fax: +55 8121268485.

E-mail address: lucabrand@gmail.com (L. Brandão).

URL: <http://www.ufpe.br/like> (L. Brandão).

using the ELISA Eu-tTG kit (Eurospital, Trieste, Italy) following manufacturer's instructions.

As controls we recruited 176 individuals, with median age of 29 (± 13 years) without clinical signs, family history of T1D and not related to the patient group. Both patients and controls were born and lived at Recife. The written informed consent was obtained from patients and controls. The local ethical committee approved the study (IMIP 1717/2010).

Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected: a tag-SNP (dbSNP: rs6432714, c.1524 + 486T > A) at intron 7, which covers SNPs from intron 6 to intron 7 of the IFIH1 gene in African, Asian and Caucasian populations ($r^2 > 0.8$, HapMap) and rs10930046 (c.1379A > G; p.His460Arg), located at exon 7, the only non-synonymous SNP tagged by rs6432714 that was already associated with other autoimmune diseases (Enevold et al., 2009; Li et al., 2010) including T1D in a genomic-wide study (Nejentsev et al., 2009).

All individuals were genotyped using the ABI 7500 real time PCR platform and commercial TaqMan® assays C__29330698_10 and C__3204802_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA) for the SNPs rs6432714 and rs10930046, respectively.

Hardy-Weinberg equilibrium, SNP association test and the best genetic model fitting with our data were performed using a likelihood ratio test and Akaike's information criterion (AIC). The SNPAssoc package (Gonzalez et al., 2007) of R v.2.15.1 (R, 2012) software was used to perform the statistical analysis. Post-hoc statistical power was also calculated using G*Power v.3.1.3 (<http://www.psych.uni-duesseldorf.de>) considering an α -error probability of 0.025. Molecular modeling calculations were made through the Swiss-Pdb viewer v.4.0.4 and the protein structure of IFIH1 was downloaded from Protein Data Bank (PDB ID: 3B6E).

3. Results

The distribution of IFIH1 SNP (rs10930046, rs6432714) allele and genotype frequencies in T1D patients stratified for the presence of AITD, CD or both and controls are shown in Table 1. Odds ratio (OR), P values and AIC estimative of the genetic association tests are reported as supplementary data (see Table S1). Allele and genotype frequencies of rs10930046 SNP were not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$) in T1D patients, when globally considered, and AITD⁺CD[−] patients. Allele and genotype frequencies of rs6432714 SNP were in Hardy-Weinberg equilibrium in both control and patient groups. rs10930046 SNP did not show association with susceptibility to T1D development ($P > 0.05$, power = 0.99, effect size = 0.29) nor with the insurgence of CD or AITD. rs6432714 SNP was associated with major risk for T1D in T1D patients globally considered (OR = 1.45, $P = 0.0365$, power = 0.98, effect size = 0.26) when compared with healthy subjects in log-additive model.

However, after Bonferroni adjustment, the association was not confirmed (P value adjusted was 0.025).

The frequency distribution of rs10930046 and rs6432714 SNPs was similar in T1D⁺AITD⁺CD⁺, T1D⁺AITD⁺CD[−], T1D⁺AITD[−]CD⁺, T1D⁺AITD[−]CD[−] patients and control individuals and no association was found.

Crystallographic structure analysis of helicase domain (PDB ID: 3B6E) was made in order to simulate in silico the mutation's effects on the protein. A variation of the force field ($\Delta E = -275.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$) was found, indicating an increase in stability of the protein when the p.His460Arg mutation is present.

4. Discussion

The analysis of IFIH1 polymorphisms showed no statistically significant association with susceptibility to the insurgence of T1D or other related autoimmune disorders (namely CD and AITD) in Brazilian patients.

Considering the role of viral infections in T1D, AITD and CD etiology (Desailloud and Hober, 2009; Knip et al., 2005) a defective mechanism on virus recognition caused by a deficient IFIH1 molecule could be hypothesized. In fact, Smyth et al. (2006) and Sutherland et al. (2007) found an association of rs1990760 SNP (p.Ala946Thr) with T1D and Graves' disease, respectively. However, Penna-Martinez et al. (2009) did not find association of this polymorphism with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. To our knowledge no study was performed on the role of IFIH1 gene and susceptibility to develop CD. Nonetheless, the small intestine lesions of CD patients could increase the chances of infection by Enterovirus, such as coxsackievirus B4, known to be one the major T1D-associated virus (Jaidane and Hober, 2008). Therefore, IFIH1 protein could have a pivotal role in development of T1D and CD simultaneously. Anyway, our findings do not support these hypotheses.

The rs10930046 polymorphism changes the amino acid at the codon position 460 from histidine to an arginine residue (p.His460Arg), both positively charged, in an alpha-helix region of helicase domain (Vasseur et al., 2011). Li et al. (2010) described a protective effect of the p.His460Arg polymorphism in development of psoriasis. Enevold et al. (2009) did not find association of this SNP with multiple sclerosis. In addition our results confirm those found by Nejentsev et al. (2009), who did not find association between this polymorphism and T1D in a Caucasian population.

Our study reports a trend for association between rs6432714 SNP and susceptibility to T1D in a Brazilian population. However, we are aware that, since the effect size for the association tests is moderated (approximately 0.30), our results could be compromised by a type II error due to a small sample size.

Moreover, the p.His460Arg structural variation could not cause interference with the capacity of double strand RNA virus detection;

Table 1

Genotypes and alleles frequencies of rs6432714^a and rs10930046 SNP of IFIH1 gene in type 1 diabetes mellitus (T1D) patients stratified according to the insurgence of autoimmune thyroiditis (AITD) and celiac disease (CD) compared with healthy controls (HC).

		AITD ⁺ CD ⁺		AITD ⁺ CD [−]		AITD [−] CD ⁺		AITD [−] CD [−]		T1D	HC
		N = 6 (%)		N = 35 (%)		N = 10 (%)		N = 145 (%)		N = 196 (%)	N = 176 (%)
Intron 7 rs6432714	A	7 (58)		16 (80)		50 (71)		215 (74)		288 (73)	282 (80)
	T	5 (42)		4 (20)		20 (29)		75 (26)		104 (27)	70 (20)
	A/A	2 (33)		17 (48)		7 (70)		82 (57)		108 (55) ^a	114 (65) ^a
	A/T	3 (50)		16 (46)		2 (20)		51 (35)		72 (37)	54 (31)
	T/T	1 (17)		2 (6)		1 (10)		12 (8)		16 (8)	8 (4)
Exon 7 rs10930046	T	7 (58)		55 (79)		17 (85)		226 (78)		305 (78)	283 (80)
	C	5 (42)		15 (21)		3 (15)		64 (22)		87 (22)	69 (20)
	T/T	2 (33)		22 (63)		7 (70)		93 (64)		124 (63)	114 (65)
	T/C	3 (50)		11 (31)		3 (30)		40 (28)		57 (29)	55 (32)
	C/C	1 (17)		2 (6)		0 (10)		12 (8)		15 (8)	7 (3)

^a Trend for association found of rs6432714 SNP between T1D versus HC using log-additive model: P value = 0.036; Odds Ratio = 1.43; Confidence Interval (95%) = 1.02–2.01, Akaike's Information Criterion = 514.3.

the lack of association found for the rs10930046 SNPs and the negative results reported by Shigemoto et al. (2009) corroborate the above mentioned hypothesis.

Since the tag-SNP rs6432714 showed a trend for association and represents the exon 7 of IFIH1, thus we could screen other genetic variations on this exon. When looking at SNP databases (such as NCBI) 12 SNPs are reported in IFIH1 exon 7, eight of which are non-synonymous SNPs. However, beyond the p.His460Arg, all variations have a MAF (Minor Allele Frequency) lower than 1%, so it is very difficult to hypothesize them as associated with T1D.

Although the studies made by Smyth et al. (2006) and Nejentsev et al. (2009) suggest a protective effect of IFIH1 for T1D development, our study indicates a trend for risk effect to develop T1D of the tag-SNP rs6432714. Four mutations of IFIH1 with a functional effect have been reported as associated with T1D: p.Glu627* is a stop codon mutation that produces a truncated protein; p.Ile923Val is a loss-of-function mutation, since it significantly reduces IFIH1-dependent synthesis of IFN- β ; and the two splice site variants (rs35337543 and rs35732034) that influence putative splice sites at introns 8 and 14, respectively (Downes et al., 2010; Shigemoto et al., 2009). These mutations are associated with defective or decreased levels of the protein but they are not associated with the ability to recognize virus double strand RNA. Mutations in the helicase domain could be associated with a better recognition of virus dsRNA, which could reflect a risk in T1D development.

5. Conclusions

In conclusion, the SNP rs10930046 is not associated with T1D or with the insurgence of AITD and CD in T1D patients. Despite that, the tag-SNP rs6432714 showed a trend of association with susceptibility to T1D and molecular modeling data suggests two other SNPs at IFIH1 at exon 7 (rs190032248 and rs139714761) that could be associated with T1D, however, most detailed and replica studies are necessary.

Acknowledgments

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PNPD program) for the financial support. R. Moura, R. Guimarães and L. Brandão are recipients of post-graduate and post-doctoral fellowship from Fundação Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, IBPG 0926-2.02/11 and BCT-0199-2.02/11, respectively).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.066>.

References

- American Diabetes Association, 2012. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 (Suppl. 1), S64–S71.
- Barera, G., et al., 2002. Occurrence of celiac disease after onset of type 1 diabetes: a 6-year prospective longitudinal study. *Pediatrics* 109, 833–838.
- Chistiakov, D.A., 2010. Interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) and virus-induced autoimmunity: a review. *Viral Immunol.* 23, 3–15.
- Desailloud, R., Hober, D., 2009. Viruses and thyroiditis: an update. *Virol. J.* 6, 5.
- Downes, K., et al., 2010. Reduced expression of IFIH1 is protective for type 1 diabetes. *PLoS One* 5.
- Enevold, C., Oturai, A.B., Sorensen, P.S., Ryder, L.P., Koch-Henriksen, N., Bendtzen, K., 2009. Multiple sclerosis and polymorphisms of innate pattern recognition receptors TLR1-10, NOD1-2, DDX58, and IFIH1. *J. Neuroimmunol.* 212, 125–131.
- Gonzalez, J.R., et al., 2007. SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23, 644–645.
- Hyoty, H., Taylor, K.W., 2002. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 45, 1353–1361.
- Jaidane, H., Hober, D., 2008. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 34, 537–548.
- Jun, H.S., Yoon, J.W., 2001. The role of viruses in type I diabetes: two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. *Diabetologia* 44, 271–285.
- Knip, M., Veijola, R., Virtanen, S.M., Hyoty, H., Vaarala, O., Akerblom, H.K., 2005. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* 54 (Suppl. 2), S125–S136.
- Li, Y., et al., 2010. Carriers of rare missense variants in IFIH1 are protected from psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2768–2772.
- Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M., Todd, J.A., 2009. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324, 387–389.
- Penna-Martinez, M., et al., 2009. The rs1990760 polymorphism within the IFIH1 locus is not associated with Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *BMC Med. Genet.* 10, 126.
- Perros, P., McCrimmon, R.J., Shaw, G., Frier, B.M., 1995. Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening. *Diabet. Med.* 12, 622–627.
- R., C.T., 2012. R, a language and environment for statistical computing. In: R.F.F.S. (Ed.), *Computing*. Vienna.
- Salminen, K., et al., 2003. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J. Med. Virol.* 69, 91–98.
- Shigemoto, T., Kageyama, M., Hirai, R., Zheng, J., Yoneyama, M., Fujita, T., 2009. Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. *J. Biol. Chem.* 284, 13348–13354.
- Smyth, D.J., et al., 2006. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat. Genet.* 38, 617–619.
- Sutherland, A., et al., 2007. Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3338–3341.
- Szopa, T.M., Titchener, P.A., Portwood, N.D., Taylor, K.W., 1993. Diabetes mellitus due to viruses—some recent developments. *Diabetologia* 36, 687–695.
- Todd, J.A., 2010. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 32, 457–467.
- van Belle, T.L., Coppieters, K.T., von Herrath, M.G., 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91, 79–118.
- van der Werf, N., Kroese, F.G., Rozing, J., Hillebrands, J.L., 2007. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23, 169–183.
- Vasseur, E., et al., 2011. The selective footprints of viral pressures at the human RIG-I-like receptor family. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4462–4474.
- Zipris, D., 2009. Epidemiology of type 1 diabetes and what animal models teach us about the role of viruses in disease mechanisms. *Clin. Immunol.* 131, 11–23.

Table S1. Results of likelihood ratio test for Association between the two polymorphisms of *IFIH1* gene (rs6432714 and rs10930046) and type 1 diabetes (T1D) compared with healthy controls. The tests for comparison between patients with also celiac disease (CD) and autoimmune thyroid disease (AITD) with healthy controls are showed. P values < 0.05 were considered significant.

Patients	Codominant model						Dominant model				Recessive model				Overdominant model				Log-additive model				
	AA x AA'		AA x A'A'		P value	AIC ^c	AA x (AA' + A'A')		P value	AIC	(AA + AA') x A'A'		P value	AIC	(AA + A'A') x AA'		P value	AIC	0.1.2		P value	AIC	
	OR ^a	CI ^b (95%)	OR	CI (95%)			OR	CI (95%)			OR	CI (95%)			OR	CI (95%)			OR	CI (95%)			
rs6432714	AITD*CD ⁺	3.17	0.51-19.51	7.12	0.58-87.24	0.25	56	3.68	0.66-20.64	0.12	54.4	4.2	0.44-40.3	0.28	55.6	2.26	0.44-11.55	0.33	55.8	2.76	0.86-8.83	0.09	54
	AITD*CD ⁻	1.99	0.93-4.23	1.68	0.33-8.57	0.20	192.4	1.95	0.94-4.05	0.07	190.4	1.27	0.26-6.26	0.77	193.5	1.9	0.91-3.98	0.09	190.7	1.61	0.90-2.88	0.11	191.1
	AITD ⁻ CD ⁺	0.60	0.12-3.00	2.04	0.22-18.64	0.64	83	0.79	0.20-3.16	0.73	81.8	2.33	0.26-20.73	0.49	81.4	0.56	0.12-2.75	0.45	81.4	1.01	0.34-3.01	0.99	81.9
	AITD ⁻ CD ⁻	1.31	0.82-2.11	2.09	0.82-5.33	0.20	444.9	1.41	0.90-2.22	0.133	443.7	1.89	0.75-4.77	0.17	444.1	1.23	0.77-1.96	0.39	445.3	1.38	0.96-1.98	0.08	443
	T1D ⁺	1.41	0.91-2.19	2.11	0.87-5.13	0.11	516.2	1.5	0.99-2.28	0.06	515	1.87	0.78-4.47	0.15	516.6	1.31	0.85-2.02	0.22	517.1	1.43	1.02-2.01	0.03	514.3
rs10930046	AITD*CD ⁺	3.11	0.50-19.15	8.14	0.66-101	0.23	55.8	3.68	0.66-20.64	0.12	54.4	4.83	0.5-47.03	0.24	55.4	2.2	0.43-11.25	0.35	55.9	2.9	0.89-9.52	0.08	53.9
	AITD*CD ⁻	1.04	0.47-2.29	1.48	0.29-7.60	0.90	195.4	1.09	0.51-2.31	0.83	193.6	1.46	0.29-7.36	0.65	193.4	1.01	0.46-2.20	0.98	193.6	1.12	0.60-2.08	0.73	193.5
	AITD ⁻ CD ⁺	0.89	0.22-3.57	0.00	0.00-0.00	1.	83.1	0.79	0.20-3.16	0.73	81.8	0.00	0.00-0.00	1.0	81.1	0.94	0.23-3.78	0.93	81.9	0.72	0.21-2.54	1.0	81.6
	AITD ⁻ CD ⁻	0.89	0.55-1.46	2.10	0.80-5.55	0.24	445.2	1.03	0.65-1.63	0.90	446	2.18	0.83-5.69	0.10	443.4	0.84	0.52-1.36	0.47	445.5	1.15	0.80-1.65	0.46	445.5
	T1D ⁺	0.95	0.61-1.49	1.97	0.78-5.01	0.30	518.3	1.07	0.70-1.63	0.76	518.5	2.00	0.80-5.03	0.13	516.3	0.90	0.58-1.41	0.65	518.4	1.15	0.82-1.62	0.40	517.9

^aodds ratio; ^bconfidence interval; ^cAkaike's information criterion.

APÊNDICE B – *STAT4* AND *IFIH1* POLYMORPHISMS AND META-ANALYSIS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS PATIENTS WITH AUTOIMMUNE POLYGLANDULAR SYNDROME TYPE III

Manuscrito submetido à revista Diabetes and Metabolism (Índice QUALIS B1, Fator de Impacto 2,38)

Autores

J de Azevêdo Silva^{a, §}, N A C Tavares ^a, M M S Santos ^{a,b}, R Moura^{a,b}, R L Guimarães ^{a,b}, J Araújo^c, S Crovella ^{a,b}, L A C Brandão ^{a,d}

Filiação:

^a Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Pediatric Endocrinology Unit of Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Brazil.

^d Department of Pathology, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

**STAT4 AND IFIH1 POLYMORPHISMS AND META-ANALYSIS IN TYPE 1
DIABETES MELLITUS PATIENTS WITH AUTOIMMUNE POLYGLANDULAR
SYNDROME TYPE III**

J de Azevêdo Silva^{a, §}, N A C Tavares ^a, M M S Santos ^{a,b}, R Moura^{a,b}, R L Guimarães ^{a,b}, J
Araújo^c, S Crovella ^{a,b}, L A C Brandão ^{a,d}

a. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

b. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

c. Pediatric Endocrinology Unit of Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Brazil.

d. Department of Pathology, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

§ Corresponding Author:

Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária. Recife, Pernambuco, Brazil.

Zip Code: 50670-901.

Phone: +55 8121268484 and fax: +55 8121268485.

Website: www.ufpe.br/like

E-mail address: j.azvedo@gmail.com

Running Title: STAT4 and IFIH1 SNPs in T1D and APSIII.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is an organ-specific autoimmune disease characterized by T-cell mediated self-destruction of insulin producing β cells in the pancreas. In addition, T1D patients are prone to develop other glandular autoimmune disorders such as autoimmune thyroid disease, featuring the type III glandular syndrome (APSIII). The signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) is able to regulate the production of proinflammatory cytokines and therefore is critical in the T helper 1 cell response in T1D autoimmunity. The interferon-induced with helicase C domain 1 (IFIH1) is activated in INF-I response and has been linked to viral infection associated to T1D development. Herein, we conducted a case-control study enrolling 173 T1D patients and 191 healthy controls, from Northeast of Brazil, in order to assess the genetic distribution of the rs7574865 and rs3024839 single-nucleotide polymorphisms (SNP) within *STAT4* and rs3747517 and rs1990760 SNPs within *IFIH1* in T1D, APSIII patients and healthy individuals. Additionally, we conducted a meta-analysis with the SNPs rs7574865 and rs1990760 from *STAT4* and *IFIH1*, respectively. Distribution of *STAT4* and *IFIH1* genotype and allele frequencies did not show differences statistically significant between patients and controls in our study population; however, the meta-analysis indicated that both *STAT4* and *IFIH1* are indeed associated to T1D worldwide. Our findings suggest that although *STAT4* and *IFIH1* SNPs are not associated in Brazilian T1D patients, the meta-analysis results indicated that they might play a role in susceptibility to T1D overall and further replica studies are necessary to corroborate these findings.

Key Words: STAT4; IFIH1; SNP; T1D; APSIII

INTRODUCTION

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is an organ-specific autoimmune disease characterized by T-cell mediated attack to the insulin producing β cells in the pancreas leading to insulin deficiency [1]. T1D is a multifactorial disease with genetic and environmental factors, as well as their interaction, playing a key role in the development of the disease. In up to one quarter of T1D patients, the unbalanced immune systems spans towards an autoimmune polyglandular syndrome type III (APSIII) which is characterized by simultaneous occurrence of autoimmune thyroid disease (AITD) and sex bias (adult females are more affected) [2,3]. Furthermore, patients with APSIII may also present celiac disease (CD). Despite the genetic variation in human leukocyte antigen (HLA) *loci* be involved in T1D development, new genes have been arising as prominent in disease's susceptibility and modulation outside their range [1,4].

The signal transducers and activators of transcription (STAT) protein 4 is a latent cytoplasmic transcription factor activated by phosphorylation in response to proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-12, IL-15, and IL-23 [5]. The STAT4 is involved in T helper 1 cell (Th1) regulation and is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells and macrophages at inflammation sites. Additionally, STAT4 mediates IL-12 signaling, which modulates Th1 cell differentiation and proliferation, INF- γ production and the development of Th17 cells [6,7]. Since, Th1 subset are critical effectors of the chronic inflammation disorder, STAT4 could play a pivotal role in the pathogenesis of several immune diseases [6–9]. In fact, single nucleotide polymorphisms (SNPs) within *STAT4* gene (at 2q32.2-q32.3 chromosome) have been reported as associated with altered risk for several autoimmune diseases in different populations [4]: rheumatoid arthritis (RA) [10], systemic lupus erythematosus (SLE) [6], Sjogren's syndrome (SS) [11] and systemic sclerosis (SSc) [12].

When considering environmental factors as players in autoimmune disorders, including T1D, viral infections have been implicated as autoimmune triggers [13,14]. The *IFIH1* gene (chromosome 2q24), also known as *MDA5*, encodes the Interferon-induced with helicase C domain 1 (IFIH1), activates type 1 interferon (IFN1) pathway and pro-inflammatory cytokines by its CARD domains, after detecting double strand RNA virus [15]. Infections by enterovirus, particularly coxsackievirus B4 strains, are known as T1D-associated, therefore, IFIH1 may have an important role in disease's development and its co-

autoimmunity related disorders [16]. Interestingly, during IFN1 activation *IFIH1* and *STAT4* share a common pathway and since both genes are known as associated to T1D [17] one can hypothesize that their variants influence upon disease's susceptibility might be stronger than the SNPs alone.

Therefore, in this study were investigated the SNPs rs7574865 (G/T) and rs3024839 (T/C), within *STAT4*, and rs3747517 (C/T) and rs1990760 (C/T), within *IFIH1*, in T1D susceptibility, as well as APSIII in a Northeast Brazilian population. Additionally, were performed a meta-analysis for the SNPs rs7574865 and rs1990760 and T1D predisposition.

SUBJECTCS AND METHODS

Patients and Controls

In this study we performed a case–control analysis in T1D patients from Pernambuco State, Northeast Brazil. Were enrolled 173 T1D patients, with age ranging from 0-18 years old at diagnosis, and mean age at onset 7,3 years $\pm$ 4,1 SD. The patients attended to three pediatric endocrinology services of public healthcare system in Recife, Brazil (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Hospital da Restauração and Hospital das Clínicas). A Free Consent Term from all patients (or their legal responsible) enrolled in this study was obtained. T1D patients were diagnosed according to American Diabetes Association (ADA) criteria and classified as T1D regarding clinical and laboratorial presentation [18].

From the T1D patients group, 47 (27,2%) were diagnosed with APSIII. The AITD diagnosis was performed using Antibodies to thyroperoxidase (Anti-TPO) detection by chemiluminescence (Immulite anti-TPO Ab, Diagnostic products Co, Los Angeles, USA) following the manufacturer's instructions. The individuals with positive anti-TPO (titer exceeding 35 IU/ml, accordingly to manufacturer's indication) were considered as having AITD.

The control group consisted of 191 healthy unrelated blood donors from the same geographic region of the patients group, with no history of autoimmune or chronic diseases, aging from 16-72 years old and mean age 38,8 years $\pm$ 14,7 SD. This study was carried out

with advanced approval from the Local Ethics Committee (IMIP Number: 762/2006 and 1717/2010).

Genotyping

Genomic DNA was obtained from whole blood and extraction protocol followed according to manufacturer's instructions (Wizard genomic DNA purification kit; Promega, Madison, MA). The DNA were stored at -20 °C until analysis. The SNPs assessed in this study were recurrently described in the literature: rs7574865 (G/T) and rs3024839 (T/C) at intron 3 and exon 4 from *STAT4*, respectively and rs3747517 (C/T) and rs1990760 (C/T) at exons 13 and 15 of the *IFIH1*. Genotyping was performed using commercially available Taqman Probes and the ABI7500 Real Time PCR platform (Applied Biosystems, Foster City, CA). Allelic discrimination followed as recommended by the manufacturer and analyzed using the SDS software 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical e Meta-analysis

Associations analysis were performed by the chi-squared test with continuity correction; the odds ratio and 95% confidence intervals were calculated based on the Woolf's method [19]. The power analyses were performed using GPower software, version 3.1 (<http://www.pscho.uni-duesseldorf.de>).

For the meta-analysis, we searched peer-reviewed articles published from 2003 to 2013 (last searched performed in November 2013) using logical equations with the following key terms on Pubmed and Web of Knowledge: "[IFIH1 or MDA5) and T1D]"; "(STAT4 and T1D)". We selected only case-control studies with the allele counts available for both SNPs analyzed. The meta-analytic tests were carried out by the "Metafor" package [20]. When the P value from the Cochran's Q test for heterogeneity was lower than 0.1 the DerSimonian-Laird's estimator was used as random-effect model or the fixed-effect model when necessary.

The Haploview Software version 4.2 was used for calculation of haplotypes associations. Power analyses were performed using G*Power 3.1.3 software (<http://www.pscho.uniduesseldorf.de>).

RESULTS

The allelic and genotype frequencies of the *STAT4* and *IFIH1* assessed SNPs in patients and controls are depicted in Table 1. All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium in all groups but the T1D only. Distribution of *STAT4* and *IFIH1* genotype and allele frequencies did not show differences statistically significant between patients and controls, indicating no association with T1D or APSIII development, even when using different genetic models, as shown in Table 2. The tested SNPs did not show linkage disequilibrium.

Furthermore, we performed meta-analyses of the rs7574865 and rs1990760 SNPs from *STAT4* and *IFIH1*, respectively. Including the present study, we gathered five works with the rs7574865 SNP [9,21–23] and eight with the rs1990760 [24–30]. The total number of cases and controls was 1392 and 1629 for the rs7574865 SNP and for rs1990760 SNP was 24244 cases and 27472 controls.

The forest plots of the meta-analyses of the rs7574865 and rs1990760 SNPs, respectively, are showed in the Figures 1 and 2. The rs7574865 SNPs were associated with T1D (OR = 1.39, CI95%: 1.23-1.56); P-value < 0.0001) as well as the rs1990760 SNP (OR = 1.17, CI95%: 1.13-1.22; P-value = 0.0001), although some heterogeneity for this result was detected ($P_{|Q|} = 0.0781$).

DISCUSSION

Several T1D patients present simultaneous autoimmune disorders and organs commitment. The APSIII is the most frequent autoimmune disorder in T1D patients, being more frequent in adults, with low childhood incidence. The individual pathogenic mechanism of T1D, AITD and CD remains unknown. Furthermore, it is unclear whether the development of these diseases is due to a shared common ethiopathological mechanism or if it is just a consequence of the presence of one autoimmune disorder function as trigger for the insurgence of another one. The regulation pathway of T cell and the viral outcome might be a molecular target to understand the pathogenesis of APSIII due to T cell activation and viral infection involvement in T1D, AITD and CD mechanisms.

In this study, we assessed the role of *STAT4* and *IFIH1* variants in T1D and APSIII susceptibility. *STAT4* is involved in Th1 regulation and its inhibition prevents the development of autoimmune diabetes in NOD mice, moreover, genetic variants are associated to autoimmune disorders in several populations, becoming a potential therapeutic approach [9,17,31]. *IFIH1* SNPs were first associated to T1D among the autoimmune diseases and since then with many other autoimmune systemic disorders. Upon viral infection, *IFIH1* activates IFN1 pathway and its release might activate *STAT4* in mature dendritic cell, followed by Th1 gene expression profile [32]. Therefore, herein we investigated whether: 1- *STAT4* and *IFIH1* variants separately may influence in T1D and APSIII development, 2- The *STAT4* and *IFIH1* variants may have their influence enhanced when occurring simultaneously and 3- Whether *STAT4* and *IFIH1* SNPs are associated to T1D in a meta-analysis study.

The *STAT4* rs7574865 is one of the most frequent tested polymorphism in *STAT4* gene and its function it is related to gene expression on a transcription level and splice variation [4]. The T allele of this particular SNP has been associated to multiple autoimmune disorders yet, the results seems to be influenced regarding to the tested population [33]. In the present study, the tested SNPs in *STAT4* and *IFIH1* genes did not show any association to T1D and/or APSIII neither separately nor together. Although the SNP rs7574865 is within the intron three, it displays a linkage disequilibrium with other SNPs with possible function [8] and the SNP rs3024839 is an intragenic missense mutation, A > G, Isoleucine > Valine, with probable function upon *STAT4* protein. Even though *STAT4* SNPs have been frequently studied as potential markers in autoimmune diseases pathway, the results are still heterogeneous indicating that *STAT4* might display a different role in those disorders. Our results agrees with the meta-analysis by Zheng et al, 2013, which revealed that *STAT4* rs7574865 polymorphism is indeed associated with several autoimmune diseases including SLE, RA, SSc and primary SS, but not to T1D, Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's disease (CD) [17]. Interestingly, SLE, RA, SSc and SS are considered systemic disorders while T1D is characterized by as an organ-specific manifestation, which might suggest that *STAT4* alterations are more related to systemic disorders than with organ-specific ones.

On the other hand, the study performed by Zervou et al., 2008, assessed the SNP rs7574865 and T1D altered risk in Crete, a genetically homogenous population [22]. The results indicated that the rs7574865 is correlated to T1D susceptibility in the Crete population. Moreover, this polymorphism was strongly associated with T1D in Northeastern Chinese population compared to healthy controls [9]. Additionally, the study performed by Fourati and

Colleagues, 2012, assessed the possible role of non-HLA genes involved with APSII, which is composed by Addison's diseases, AITD and/or T1D, in Tunisian patients [34]. The results indicated that the rs7574865 within *STAT4* was associated to APSII syndrome but not with T1D and AITD alone, suggesting that *STAT4* is involved with the co-occurrence of autoimmunity endocrinopathies in APSII individuals.

IFIH1 is a helicase that senses viral dsRNA and, when activated, supports the transcription of type I IFN and IFN-induced genes [35]. Since IFIH1 acts during viral infections, our previously publication hypothesized that a defective mechanism on virus recognition might be caused by a deficient IFIH1 protein [36]. However, in the present study we did not find association to rs3747517 (A>G, Histidine>Arginine, exon 13) or rs1990760 (C>T, Alanine > Threonine, exon 15) and T1D development or APSIII syndrome. Despite that, even when inserting our data in the meta-analysis the rs1990760 within *IFIH1* was associated to T1D. The IFIH1 over expression in murine models is related to a chronic state of IFN-I production [37]. In Multiple Sclerosis (MS) patients, an autoimmune disease, the IFIH1 gene is more strongly expressed, together with Toll-like Receptor 7 (TLR-7), associated to IFN-I response and consequently IFN signature [38]. The *IFIH1* rs1990760 SNP T allele is associated to an increased expression of IFIH1 in PBMCs and sensibility to IFN- α [39]. Therefore, both *STAT4* and *IFIH1* variants are associated to T1D and this might be due to its regulation of IFN-I, leading to an altered chronic expression of immune response.

In conclusion, we did not demonstrate any association of *STAT4* or *IFIH1* SNPs with T1D development in a Northeast Brazilian population. Noteworthy, our study might lack the ability of identify genetic associations due to the low power values and a much larger number of individuals should be required in future replication studies. In addition, the meta-analysis results showed association among the SNP rs7574865 and rs1990760 from *STAT4* and *IFIH1*, respectively, with TD1, even including our negative associations.

This work was supported by the following Brazilian Funding agencies: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have not declared any conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ* 2006;175:165–70.
- [2] Dittmar M, Kahaly GJ. Genetics of the autoimmune polyglandular syndrome type 3 variant. *Thyroid* 2010;20:737–43.
- [3] Paper O. Thyroid Autoimmunity in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes mellitus 2000:113–8.
- [4] Liang Y-L, Wu H, Shen X, Li P-Q, Yang X-Q, Liang L, et al. Association of STAT4 rs7574865 polymorphism with autoimmune diseases: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012;39:8873–82.
- [5] Levy DE, Darnell JE. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651–62.
- [6] Kobayashi S, Ikari K, Kaneko H, Kochi Y, Yamamoto K, Shimane K, et al. Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Arthritis Rheum* 2008;58:1940–6.
- [7] Zervou MI, Mamoulakis D, Panierakis C, Boumpas DT, Goulielmos GN. STAT4: a risk factor for type 1 diabetes? *Hum Immunol* 2008;69:647–50.
- [8] Zheng J, Yin J, Huang R, Petersen F, Yu X. Meta-analysis reveals an association of STAT4 polymorphisms with systemic autoimmune disorders and anti-dsDNA antibody. *Hum Immunol* 2013.
- [9] Bi C, Li B, Cheng Z, Hu Y, Fang Z, Zhai A. Association study of STAT4 polymorphisms and type 1 diabetes in Northeastern Chinese Han population 2013:19–21.
- [10] Stark K, Rovenský J, Blazicková S, Grosse-Wilde H, Ferencik S, Hengstenberg C, et al. Association of common polymorphisms in known susceptibility genes with rheumatoid arthritis in a Slovak population using osteoarthritis patients as controls. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R70.

- [11] Palomino-Morales RJ, Diaz-Gallo LM, Witte T, Anaya JM MJ. Influence of STAT4 polymorphism in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2010;37:1016–9.
- [12] Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suárez H, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet* 2009;18:2071–7.
- [13] Jun HS, Yoon JW. The role of viruses in type I diabetes: two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. *Diabetologia* 2001;44:271–85.
- [14] Salminen K, Sadeharju K, Lönnrot M, Vähäsalo P, Kupila A, Korhonen S, et al. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol* 2003;69:91–8.
- [15] Chistiakov D a. Interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) and virus-induced autoimmunity: a review. *Viral Immunol* 2010;23:3–15.
- [16] paper n.d.
- [17] Zheng J, Yin J, Huang R, Petersen F, Yu X. Meta-analysis reveals an association of STAT4 polymorphisms with systemic autoimmune disorders and anti-dsDNA antibody. *Hum Immunol* 2013.
- [18] Gabir M M et al 2000. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization Criteria for Hyperglycemia 2000;23.
- [19] Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955;19:251–3.
- [20] Viechtbauer W. Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package 2010;36.
- [21] Lee H, Park H, Yang S, Kim D, Park Y. STAT4 Polymorphism Is Associated with Early-Onset Type 1 Diabetes , but Not with Late-Onset Type 1 Diabetes 2008;98:93–8.
- [22] Zervou MI, Mamoulakis D, Panierakis C, Boumpas DT, Goulielmos GN. STAT4 : A risk factor for type 1 diabetes ? 2008;4:647–50.
- [23] Martínez a, Varadé J, Márquez a, Cénit MC, Espino L, Perdigones N, et al. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. *Arthritis Rheum* 2008;58:2598–602.
- [24] Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, et al. © 2006 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturegenetics> A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs 2006;38:617–9.
- [25] Cooper JD, Ph D, Downes K, Phil M, Yang JHM, Sc B, et al. Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease 2008:2767–77.

- [26] Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. UKPMC Funders Group Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes 2008;39:857–64.
- [27] Liu S, Wang H, Jin Y, Podolsky R, Prasad M V, Reddy L, et al. IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells 2009;18:358–65.
- [28] Aminkeng F, Autreve JE Van, Weets I, Quartier E, Schravendijk C Van, Gorus FK, et al. IFIH1 gene polymorphisms in type 1 diabetes : Genetic association analysis and genotype – phenotype correlation in the Belgian population. HIM 2009;70:706–10.
- [29] Jermendy A, Szatmári I, Laine AP, Lukács K. The interferon-induced helicase IFIH1 Ala946Thr polymorphism is associated with type 1 diabetes in both the high-incidence Finnish and the medium-incidence Hungarian populations 2010:98–102.
- [30] Yang HUI, Wang Z, Xu K, Gu R, Chen H, Yu DAN, et al. IFIH1 gene polymorphisms in type 1 diabetes : genetic association analysis and genotype-phenotype correlation in Chinese Han population 2011:1–7.
- [31] Yang Z, Chen M, Ellett JD, Fialkow LB, Carter JD, McDuffie M, et al. Autoimmune diabetes is blocked in Stat4-deficient mice. J Autoimmun 2004;22:191–200.
- [32] Kariuki SN, Kirou KA, Macdermott EJ, Barillas-arias L, Crow MK, Niewold TB. Cutting Edge : Autoimmune Disease Risk Variant of STAT4 2008:3–7.
- [33] Lee YH, Woo J-H, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between the rs7574865 polymorphism of STAT4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Rheumatol Int 2010;30:661–6.
- [34] Fourati H, Bouzid D, Abida O, Kharrat N, Mnif F, Haddouk S, et al. Non-HLA autoimmunity genetic factors contributing to Autoimmune Polyglandular Syndrome type II in Tunisian patients. Hum Immunol 2012;73:740–6.
- [35] Robinson T, Kariuki SN, Franek BS, Kumabe M, Kumar A a, Badaracco M, et al. Autoimmune disease risk variant of IFIH1 is associated with increased sensitivity to IFN- α and serologic autoimmunity in lupus patients. J Immunol 2011;187:1298–303.
- [36] Moura R, Araujo J, Guimarães R, Crovella S, Brandão L. Interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1): Trends on helicase domain and type 1 diabetes onset. Gene 2013;516:66–8.
- [37] Crampton SP, Deane J a, Feigenbaum L, Bolland S. Ifih1 gene dose effect reveals MDA5-mediated chronic type I IFN gene signature, viral resistance, and accelerated autoimmunity. J Immunol 2012;188:1451–9.
- [38] Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, Angerstein C, Kandulski O, Fatum C, et al. Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. J Neuroinflammation 2012;9:140.

- [39] Rönnblom L, Alm G V, Eloranta M-L. The type I interferon system in the development of lupus. *Semin Immunol* 2011;23:113–21.

Figures and Tables captions

Figure 1. Forest plot from the meta-analysis of the rs7574865 single nucleotide polymorphism in the *STAT4* gene.

Figure 2. Forest plot from the meta-analysis of the rs1990760 single nucleotide polymorphism in the *IFIH1* gene.

Table 1. Allelic and genotype frequencies of the *STAT4* (rs7574865 and rs3024839) and *IFIH1* (rs3747517 and rs1990760) SNPs assessed in type 1 diabetes mellitus patients (T1D) and healthy controls (HC).

Table 2. Odds ratio, 95% confidence intervals and p-values of the test for association between the *STAT4* (rs7574865 and rs3024839) and *IFIH1* (rs3024839 and rs1990760) variants and both type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome type III.

Figure 1. Forest plot from the meta-analysis of the rs7574865 single nucleotide polymorphism in the *STAT4* gene.

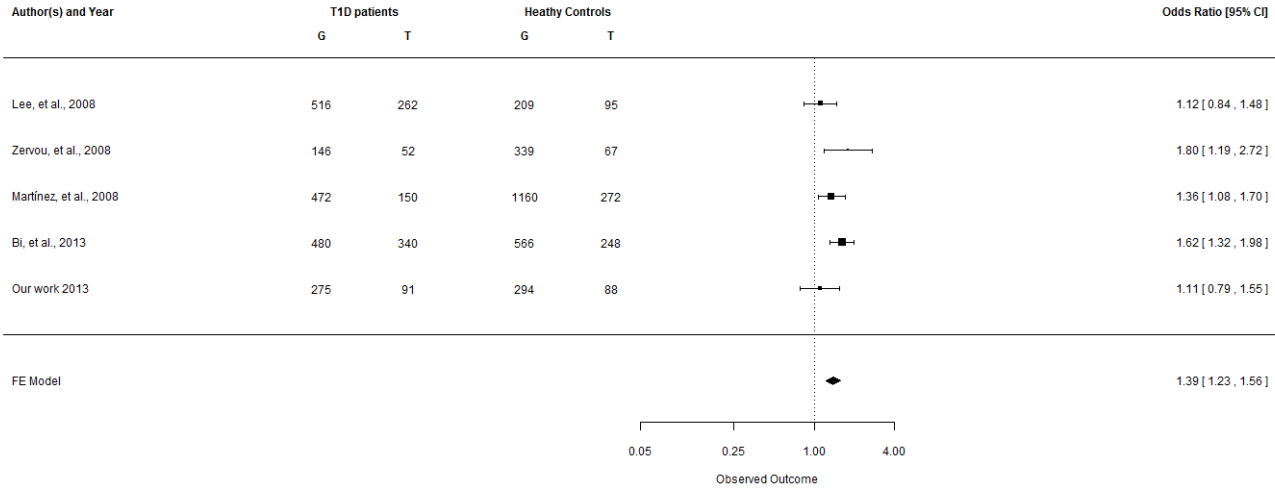


Figure 2. Forest plot from the meta-analysis of the rs1990760 single nucleotide polymorphism in the *IFIH1* gene.

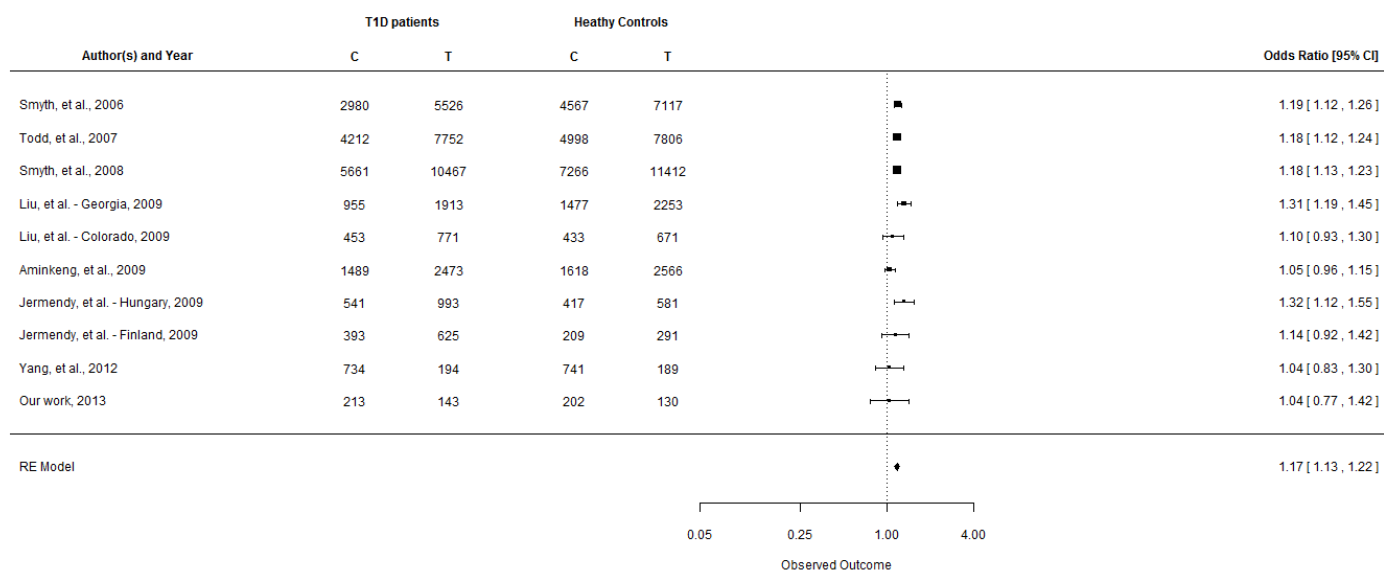


Table 1. Allelic and genotype frequencies of the STAT4 (rs7574865 and rs3024839) and IFIH1 (rs3747517 and rs1990760) SNPs assessed in type 1 diabetes mellitus patients (T1D) and healthy controls (HC).

Variant	HC		T1D+AITD+CD		T1D only		APSIH	
	n	Freq.	n	Freq.	n	Freq.	n	Freq.
rs7574865								
G	294	0,77	260	0,75	197	0,78	63	0,68
T	88	0,23	86	0,25	57	0,22	29	0,32
GG	112	0,59	98	0,57	76	0,60	22	0,48
GT	70	0,37	64	0,37	45	0,35	19	0,41
TT	9	0,05	11	0,06	6	0,05	5	0,11
rs3024839								
T	353	1,00	331	1,00	245	1,00	86	1,00
C	1	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
TT	176	0,99	165	0,99	122	0,99	43	1,00
TC	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0	0,00
CC	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
rs3747517								
C	230	0,68	249	0,72	179	0,72	70	0,74
T	110	0,32	95	0,28	71	0,28	24	0,26
CC	77	0,45	87	0,51	63	0,50	24	0,51
CT	76	0,45	75	0,44	53	0,42	22	0,47
TT	17	0,10	10	0,06	9	0,07	1	0,02
rs1990760								
C	202	0,61	201	0,60	150	0,61	51	0,57
T	130	0,39	135	0,40	96	0,39	39	0,43
CC	59	0,36	67	0,40	52	0,42	15	0,33
CT	84	0,51	67	0,40	46	0,37	21	0,47
TT	23	0,14	34	0,20	25	0,20	9	0,20

Table 2. Odds ratio, 95% confidence intervals and p-values of the test for association between the *STAT4*

rs7574865										
comparison	11 X 01 X 00			01 X 00			11 X 00			1 X 0
	P-value	O.R.	95% CI	P-value	O.R.	95% CI	P-value	O.R.	95% CI	P-value
HC x T1D	0,7737	1,04	(0,68-1,61)	0,9302	1,40	(0,56-3,51)	0,6320	1,11	(0,79-1,55)	0,6258
HC x T1D only	0,9753	0,95	(0,59-1,52)	0,9184	0,98	(0,34-2,87)	0,8095	0,97	(0,66-1,41)	0,9371
HC x APSIII	0,1864	1,38	(0,7-2,73)	0,4507	2,83	(0,86-9,25)	0,1570	1,54	(0,93-2,54)	0,1188
T1D only x APSIII	0,2038	1,46	(0,71-2,98)	0,3947	2,88	(0,8-10,34)	0,1910	1,59	(0,94-2,7)	0,1127
rs3024839										
HC x T1D	ND	1,07	(0,09-23,29)	0,5067	ND	ND	ND	1,07	(0,07-17,12)	0,5073
HC x T1D only	ND	1,44	(0,09-23,29)	0,6444	ND	ND	ND	1,44	(0,09-23,15)	0,6449
HC x APSIII	ND	0,00	ND	0,4415	ND	ND	ND	0,00	ND	0,4420
T1D only x APSIII	ND	0,00	ND	0,5812	ND	ND	ND	0,00	ND	0,5817
rs3747517										
HC x T1D	0,2983	0,87	(0,53-1,38)	0,6264	0,52	(0,22-1,2)	0,1821	0,80	(0,57-1,11)	0,2046
HC x T1D T1D only	0,5700	0,85	(0,53-1,38)	0,6000	0,65	(0,27-1,55)	0,4438	0,83	(0,58-1,18)	0,3480
HC x T1D APSIII	0,2176	0,93	(0,48-1,8)	0,9589	0,19	(0,02-1,49)	0,1519	0,72	(0,43-1,2)	0,2539
T1D only x APSIII	0,4346	1,09	(0,55-2,16)	0,9433	0,29	(0,04-2,43)	0,4108	0,86	(0,5-1,48)	0,6929
rs1990760										
HC x T1D	0,1037	0,70	(0,37-1,04)	0,1805	1,30	(0,69-2,45)	0,5124	1,04	(0,77-1,42)	0,8486
HC x T1D only	0,0688	0,62	(0,37-1,04)	0,0941	1,23	(0,63-2,43)	0,6645	0,99	(0,71-1,39)	0,9569
HC x APSIII	0,5943	0,98	(0,47-2,06)	0,8848	1,54	(0,59-4,01)	0,5259	1,19	(0,74-1,9)	0,5512
T1D only x APSIII	0,5036	1,58	(0,73-3,43)	0,3298	1,25	(0,48-3,24)	0,8351	1,19	(0,73-1,95)	0,5567

(rs7574865 and rs3024839) and *IFIH1* (rs3024839 and rs1990760) variants and both type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome type III.

The 0 represents the less frequent allele, 1 de most frequent; OR = Odds Ratio; CI= Confidence Interval; APS= Autoimmune polyglandular Syndrome; T1D: Type 1 diabetes; HC= Health control.

ANEXO A – INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA DIABETES & METABOLISM

& Diabetes *Metabolism*

Instructions for authors

"Diabetes & Metabolism" publishes studies on diabetes, metabolism or nutrition. We only consider contributions submitted in English, and presented according to the "Presentation of Manuscripts".

Contributions may be submitted in the form of:

- **Original articles** should not exceed 4 000 words, can include up to 6 tables and/or figures and a maximum of 40 references
- **Review papers** should not exceed 7 500 words, can include up to 8 tables and/or figures and up to 60 references
- **Letters to the editor** should not exceed 1 000 words, and up to 10 references
- **Brief reports** should not exceed 1 750 words plus one table or figure, and 15 references
- **Commentaries** should not exceed 1750 words plus one table or figure and up to 15 references.
- **Editorials**, are usually solicited by the editors, should not exceed 1 500 words plus one table, and 15 references

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

- Submitting an article via Internet

Brief overview of the EES system

New users can access the home page of *Diabetes & Metabolism* : <http://ees.elsevier.com/diabet/>. Click on "register" at the top of the screen and fill in the required information. You will receive confirmation of your registration together with your "username" and "password" by e-mail. Registration is required only on your first visit. On subsequent occasions, you only need to click on "login", then on "author login" to access the system directly.

Once you have been identified and have entered the system, to submit a manuscript, follow the instructions on the screen and enter the details required for the submission and then upload your files.

A single file is required for the title page, the manuscript text, the tables and the legends of the figures (refer to presentation of manuscripts).

Each figure (diagrams, drawings, and color or black and white photos) should be submitted in an individual file. Authors are invited to refer to the artwork quality instructions at: authors.elsevier.com/ArtworkInstructions.html?dc=A11. Please contact our help service for authors with any technical problems: authorsupport@elsevier.com

PRESENTATION OF MANUSCRIPTS

• Cover letter

The cover letter must provide the address, telephone and fax number as well as the e-mail address of the corresponding author. It must include the following statement signed by all authors: *"We approve the submission of this paper to "Diabetes & Metabolism" for publication. We confirm that neither the manuscript submitted nor any part of it has been published or is being considered for publication elsewhere (abstracts < 300 words excepted). We confirm that the paper has been read and approved by all authors."*

• Typeface and line spacing in manuscript

Microsoft Word with Times New Roman font, character 12; line spacing 1.5.

• Abbreviations

Try to avoid using abbreviations. Any abbreviations should be defined: oral glucose tolerance test (OGTT). If necessary, a list of abbreviations can be provided.

• Title page

The title page should include:

- manuscript title without abbreviations;
- initials of first and middle names, and the last name of each author;
- name and address of department(s) and institution(s); if several institutions are involved, they must be identified with the corresponding author(s) by an **alphabetic letter** in superscript;
- a short running title of no more than 40 characters;
- address, e-mail, phone and fax number of the corresponding author.

• Summary/Abstract

Provide a summary with no more than 250 words, that includes four paragraphs: **Aim, Methods, Results, Conclusion**. At the end of the summary please provide up to five keywords. Do not use abbreviations in the Summary.

• Main text of the article

The manuscript should be divided into sections: **Introduction, Methods, Results, Discussion**.

• Acknowledgements and Funding

This should follow the main text.

• Conflict of interest section

In accordance with international practices concerning conflicts of interest, all submitted manuscripts must be accompanied by a declaration of conflict of interest.

A conflict of interest exists when an author or co-author has financial or personal interests with other persons or organisations that may influence his professional judgement concerning an essential factor (such as a patient's wellbeing or integrity of the research). The main conflicts of interest include financial interests, clinical trials, occasional business involvements and family connections.

All authors of the publication must declare all of the relationships they have had during the past 3 years that might be considered to have a potential conflict of interest but only in connection with the published article.

On submitting a manuscript electronically via EES, the completed declaration(s) must be included with the other components of the submitted article.

When the document(s) has not been sent along with the submitted manuscript, the following statement will be added to the published article:

Conflict of interest: the authors have not declared any conflicts of interest.

• References

Number references in brackets consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. References first cited in the legend of a table or a figure should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure. Articles in press may be quoted (cite the journal and add "in press" in parentheses); in this case, a copy of the manuscript must be provided with the manuscript.

Use the Vancouver style for references, as given below. For detailed information see Lancet 1979;1:428–31.

Standard Journal Article List all authors when six or fewer;

when seven or more, list only first six authors and add et al.:

Massin P, Aubert JP, Eschwege E, Erginay A, Bourovitch JC, Ben Mehidi A, et al. Evaluation of a screening program for diabetic retinopathy in a primary care setting Dodia (Dépistage ophtalmologique du diabète) study. *Diabetes Metab* 2005;31:153–62

Abstract in a journal supplement "Abstract" must be mentioned in brackets at the end of the reference, and the volume number must be followed by (suppl):

Bellanné-Chantelot C, Riveline JP, Larger E, Valéro R, Gautier JF, Ducluzeau Ph, et al. Description phénotypique du diabète MODY3 à partir de l'analyse rétrospective de 89 cas. (Abstract) *Diabetes Metab* 2005;31 (suppl 1):1S17 [Abstract]

Chapter in a book (the authors are the editors)

Marks V, Rose RC, eds. *Hypoglycaemia*. Oxford: Blackwell 1965, 240–58

Chapter in a book (the authors are not the editors)

Loubatières A. Pharmacological aspects of insulin secretion. In: Rodriguez RR, Vallance-Owen J, eds. *Diabetes*. Proc 7th Congress Internat Diabetes Fed. Amsterdam: Excerpta Medica 1971,137–58

• Legends of Figures

The legends corresponding to each figure should be given on a separate page, after the references. The figures should be numbered with arabic numerals.

• Tables

Tables should be numbered with arabic numerals.

• Figures

Each figure must be provided in a separate document.

If an already published illustration is used in a manuscript, written authorization is required from the author or authors of that illustration.

• Supplementary Tables and Figures

In the case where additional detailed information is needed to support the manuscript, and 6 tables/figures are not adequate, these results can be made available in electronic format.

DIABETES AND METABOLISM REVIEWING AND PRODUCTION

Articles will be reviewed, and a manuscript may be refused, require extensive revisions, or be acceptable with minor revisions. If the article requires revision, the authors must resubmit a revised manuscript within one month.

Once the article is accepted for publication, it will be edited, and the proofs will be sent as a PDF to the author for corrections, along with possible questions from the editor. Corrections are limited to typographical errors. Authors are responsible for returning the corrected proofs to the publisher within 48 hours of reception at all times of the year. In the case of delay, the publisher reserves the right to print the manuscript without the author's corrections.

The corresponding author will be asked to complete a form for the transfer of copyright. This should be completed and signed by the corresponding on behalf of all the authors and returned to the publisher.

The corresponding author will receive an order form where he can order reprints. He will receive a PDF of the published article.

After publication, all requests for reproduction should be addressed to the publisher.