

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Endocrinologia

Dissertação de Mestrado

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs2304256
NO GENE *TYK2* E O DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Felipe Mateus Pellenz

Porto Alegre, dezembro de 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Endocrinologia

**Investigação da associação entre o polimorfismo rs2304256 no gene *TYK2* e o
diabetes mellitus tipo 1**

Felipe Mateus Pellenz

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daisy Crispim Moreira

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Endocrinologia.

Porto Alegre, dezembro de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Pellenz, Felipe Mateus
Investigação da associação entre o polimorfismo
rs2304256 no gene TYK2 e o diabetes mellitus tipo 1 /
Felipe Mateus Pellenz. -- 2019.
56 f.
Orientadora: Daisy Crispim Moreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Genética. 3.
Tirosina quinase 2. 4. Polimorfismo. 5. rs2304256. I.
Moreira, Daisy Crispim, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a todos aqueles
que não desistiram dos seus sonhos.

“O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria”.

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

“De todos os ingredientes da vida, a gratidão é o mais doce”. - Daniel Duarte

Agradeço, primeiramente, à minha família. Sem meus pais, Rosani e Volmir e minha irmã, Amanda, cujo apoio e incentivo sempre foram enormes, com certeza este trabalho não teria acontecido. Amo vocês para sempre, e devo minha vida a vocês.

À minha orientadora, Daisy Crispim, por ter aceitado me orientar sem nem me conhecer. Obrigado pela oportunidade e por todos os ensinamentos, e por sempre acreditar em mim. Obrigado pela paciência e por aguentar meus surtos de ansiedade!

A todos os envolvidos com o Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, obrigado por sempre dar o suporte necessário.

A toda a equipe do grupo de Diabetes do Serviço de Endocrinologia, em especial à Cristine Dieter, Denise Sortica, Taís Assmann e Bianca Marmontel, que foi uma segunda orientadora para mim.

Às minhas amigas Mayara Souza, Pâmela Nique, Poliana Correia, Joana Lemos, Marjoriê Buffon, Natali Cardoso e Ellen Scotton por dividirem a grande experiência de pós-graduação comigo.

Aos meus amigos de alma que sempre acreditaram em mim, e sempre me incentivaram a ser uma pessoa melhor. Em especial à Gabriela da Rosa, Fernanda Schmökel, Luana Pellenz, Symon Mendes, Jhonathan Rath, Melissa Alves e Sue Tashima. Amo vocês para sempre!

A todos os meus familiares que sempre apoiaram a minha decisão de continuar estudando e me especializando, e por sempre confiarem a mim a importante tarefa de interpretar seus exames laboratoriais.

A todos os demais amigos que sempre contribuíram com palavras de afeto, e que sempre me acolheram quando eu precisava.

As minhas professoras da graduação que continuaram me auxiliando ao longo do mestrado, Priscila Lora e Tanise Gemeli. Vocês são muito especiais na minha formação.

À UNISINOS e ao professor Hugo Bock que me receberam de mãos abertas no estágio docência.

Ao apoio financeiro do CNPq, CAPES, FIPE-HCPA e FAPERGS.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Esta dissertação de mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de uma breve introdução geral sobre o assunto da dissertação e na sequência é apresentado o artigo original. Após, são apresentadas as considerações finais.

Artigo original 1: The rs2304256 polymorphism in the *TYK2* gene is associated with protection against type 1 diabetes mellitus in a Brazilian population.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	9
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
CAPÍTULO 1: REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Epidemiologia do Diabetes Mellitus.....	18
1.2 Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)	18
 1.2.1 Genética do Diabetes Mellitus Tipo 1.....	21
1.3 Tirosina Quinase 2 (TYK2)	22
 1.3.1 Polimorfismos no Gene <i>Tirosina Quinase 2</i>	25
1.4 Justificativa	29
2. OBJETIVOS	30
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2 - ARTIGO ORIGINAL.....	35
CONCLUSÃO.....	54

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Referencial Teórico

AR – artrite reumatoide

CoU – colite ulcerativa

CXCL10 – ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-C

CD – células dendríticas

DoC – doença de Crohn

DM – diabetes mellitus

DM1 – diabetes mellitus tipo 1

EM – esclerose múltipla

ERBB3 – receptor tirosina quinase erb-b2 3

GAD65 – descarboxilase do ácido glutâmico

GLIS3 – GLI-similar 3

GWAS – *genome wide association studies*

HLA – antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*)

IA-2 – fosfatase de tirosina-2

IA2- β – fosfatase de tirosina-2 β

IDF – *International Diabetes Federation*

IFNAR1 – receptor do interferon- α

IFN-I – interferon tipo I

IFN α – interferon- α

IFN β – interferon- β

JAKs – janus quinase

JH4 – região janus quinase homóloga 4

LES – lúpus eritematoso sistêmico

LPS – lipopolissacarídeo

NK – *natural killer*

PIC – ácido *polyinosinicpolycitidic*

RC – razão de chances

RE – retículo endoplasmático

SNPs – polimorfismos de troca única (*single nucleotide polymorphisms*)

STATs – sinais transdutores e ativadores de transcrição

T1DGC – *Type 1 Diabetes Genetics Consortium*

TYK2 – *tirosina quinase 2*

Artigo Original 1

BMI – body mass index

DKD – diabetic kidney disease

DR – diabetic retinopathy

ERBB3 – *erb-b2 receptor tyrosine kinase 3*

GLIS3 – *GLI-similar 3*

GWAS – genome wide association studies

HbA1c – glycated hemoglobin

HLA – human leukocyte antigen

HWE – Hardy-Weinberg Equilibrium

IFNAR – interferon- α receptor

IFN-I – type I interferon

IFN α – interferon- α

JAK – Janus kinase

JH4 – Janus kinase homology region 4

MS – multiple sclerosis

OR – odds ratio

PCR – polymerase chain reaction

PIC – polyinosinicpolycitidic acid

RA – rheumatoid arthritis

SLE – systemic lupus erythematosus

SNPs – single nucleotide polymorphisms

STATs – signal transducer and activators of transcription

T1DM – type 1 diabetes mellitus

TYK2 – tyrosine kinase 2

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é causado pela destruição autoimune das células-beta pancreáticas, levando a ausência total de produção de insulina e fazendo com que os pacientes necessitem de insulina exógena para a sobrevivência. Essa doença é causada por uma complexa interação entre fatores ambientais e genéticos. Polimorfismos de troca única (SNPs) em mais de 60 genes estão associados ao desenvolvimento de DM1, sendo que SNPs no *locus HLA* de classe II (*HLA DR/DQ*) possuem o maior impacto na suscetibilidade à doença. SNPs em *loci* não-HLA parecem interagir com o HLA, aumentando ou diminuindo o risco de DM1. Em geral, estes genes não-HLA associados com a suscetibilidade ao DM1 estão expressos tanto no sistema imune quanto nas células-beta pancreáticas.

Neste contexto, o gene *tirosina quinase 2 (TYK2)* é um novo gene candidato para o DM1, pois parece possuir um papel importante na regulação da apoptose das células-beta e na inflamação induzidas por citocinas, via modulação da rota do interferon- α (IFN α). Além disso, diversos SNPs no gene *TYK2* já foram associados com outras doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla e artrite reumatoide. Entretanto, pouco se sabe em relação a associação de SNPs nesse gene e o DM1. O SNP rs2304256 tem sido associado com proteção para estas doenças autoimunes e, até o momento, somente dois estudos avaliaram a associação desse SNP e o DM1, sendo os resultados inconclusivos. Sendo assim, este trabalho teve como principal objetivo investigar a associação entre o SNP rs2304256 (C/A) no gene *TYK2* e o DM1 em uma população do Brasil.

Este estudo de caso-controle incluiu 478 pacientes com DM1 (casos) e 518 indivíduos sem DM1 (controles) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O SNP rs2304256 (C/A) foi genotipado usando-se ensaio de discriminação alélica por PCR em tempo real, com sondas TaqMan MGB (Thermo Fisher Scientific). Além disso, os genótipos DR/DQ do *HLA* de classe II que são associados com maior risco para o DM1 foram usados para se controlar uma possível associação do SNP rs2304256 com o DM1 por esse *locus*.

Os resultados deste trabalho mostram que as frequências genótípicas do SNP rs2304256 diferiram significativamente entre casos e controles (DM1: C/C 60,0%, C/A 33,7%, A/A 6,3% vs. controles: C/C 54,4%, C/A 31,9%, A/A 13,7%; $p < 0,0001$). A frequência do alelo A foi de 23,1% entre os pacientes com DM1 e de 29,6% no grupo controle ($p = 0,001$). O genótipo A/A se manteve associado com proteção contra o DM1 nos modelos de herança recessivo (RC = 0,482, IC 95% 0,288 – 0,806) e aditivo (RC = 0,470, IC 95% 0,278 – 0,794) após ajuste para os genótipos de *HLA* (*HLA DR/DQ - DR4/DQ8, DR3/DR4-DQ8* ou *DR3/DR*) de alto risco para DM1, sexo e etnia.

Portanto, nossos resultados demonstram que o genótipo A/A do SNP rs2304256 (C/A) está associado com proteção para o DM1 em uma população do Sul do Brasil. Nenhum estudo anterior avaliou este polimorfismo no Brasil.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is caused by an autoimmune destruction of pancreatic beta-cells, which leads to total absence of insulin production, rendering patients insulin-dependent for life. The disease arises from a complex interaction among genetic and environmental factors. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in more than 60 genes have been associated with T1DM, with *HLA class II* SNPs (*HLA DR/DQ*) having the greatest impact on disease susceptibility. Non-HLA SNPs seem to interact with the HLA, increasing or decreasing the risk for T1DM. In general, these non-HLA genes associated with susceptibility for T1DM are expressed both in immune cells and in beta-cells.

In this context, *tyrosine kinase 2 (TYK2)* is a new candidate gene for T1DM since it seems to play an important role in regulating cytokine induced-apoptotic and pro-inflammatory pathways in beta-cells through modulation of interferon- α (IFN α) signaling. Moreover, SNPs in *TYK2* gene have been associated with other autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis. However, the association of SNPs in *TYK2* and T1DM remains inconclusive. The rs2304256 SNP has been associated with protection against these autoimmune diseases and, to date, only two studies evaluated the association of this SNP and T1DM, with inconclusive results. Thus, the aim of the present study was to investigate the association between the rs2304256 SNP in *TYK2* gene and T1DM in a Brazilian population.

This case-control study comprised 478 patients with T1DM (cases) and 518 non-diabetic subjects (controls) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The rs2304256 (C/A) SNP was genotyped by allele discrimination-real time PCR technique using TaqMan MGB probes (Thermo Fisher Scientific). In addition, *HLA class II DR/DQ* genotypes associated with high risk for T1DM were genotyped to control a possible association of the *TYK2* rs2304256 SNP with T1DM for these *HLA* genotypes.

Our results demonstrate that the genotype frequencies of the rs2304256 SNP differed significantly between T1DM patients and non-diabetic subjects (T1DM: C/C 60.0%, C/A 33.7%, A/A 6.3% vs. Controls: C/C 54.4%, C/A 31.9%, A/A 13.7%; $P = < 0.0001$). The A allele frequency was 23.1% in patients with T1DM and 29.6% in the control group ($P = 0.001$). The A/A genotype remained associated with protection against T1DM under recessive (OR = 0.482, 95% CI 0.288 – 0.806) and additive (OR = 0.470, 95% CI 0.278 – 0.794) inheritance models, after adjustment for *HLA* high-risk genotypes (*HLA DR/DQ – DR4/DQ8, DR3/DR4-DQ8* or *DR3/DR*), gender and ethnicity.

Thus, our results demonstrate that the *TYK2* rs2304256 A/A genotype is associated with protection for T1DM in a Brazilian population. No previous study has evaluated this SNP in Brazil.

CAPÍTULO 1: REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas de etiologia múltipla, caracterizado pela hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina (1). O DM vem se tornando, cada vez mais, um sério problema de saúde pública devido ao aumento de sua prevalência na população. De acordo com o atlas 2017 da Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation - IDF*), atualmente 424,9 milhões de adultos em todo o mundo apresentam algum tipo de DM e a estimativa é que esse número aumente para 628,6 milhões de indivíduos afetados por essa doença em 2045 (2). No Brasil, atualmente existem mais de 12 milhões de pessoas vivendo com algum tipo de DM, correspondendo a 8,7% da população (2). Com relação ao DM tipo 1 (DM1), atualmente existem 1.106.500 crianças e adolescentes (<20 anos de idade) com essa doença, com cerca de 130 mil novos casos por ano. O Brasil é o 3º país com maior incidência desse tipo de DM em todo o mundo, com 7.600 novos casos por ano (em crianças com <20 anos de idade) (2).

1.2 Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)

O DM1 é uma doença autoimune complexa causada pela interação entre fatores genéticos e ambientais, que acarreta na hiperglicemia crônica (1, 3, 4). O DM1 acomete principalmente crianças e indivíduos jovens e é causado pelo ataque autoimune contra as células-beta pancreáticas, caracterizando a insulite, o que leva a uma deficiência total na

secreção de insulina (1, 3, 4). Como consequência, os indivíduos afetados necessitam de tratamento com insulina exógena para a sobrevivência (1, 3, 4). A insulite ocorre em consequência da invasão de células imunes no pâncreas e o encontro destas com as células-beta pancreáticas que apresentam o antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen - HLA*) de classe I superexpressado. Além disso, células do sistema imune, bem com as células-beta secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o que exacerba a insulite e desencadeia a morte das células-beta (5, 6).

O estágio inicial do DM1 é, portanto, caracterizado pela infiltração de células do sistema imune inato, incluindo macrófagos e células dendríticas (CD), que fazem o recrutamento de linfócitos para o interior das ilhotas, além da apresentação de autoantígenos de células-beta (3, 7). Em princípio, o sistema imune é capaz de regular os mecanismos inflamatórios desencadeados. No entanto, quando ocorre uma falha nesta regulação, se inicia a fase de destruição das células-beta, caracterizada por um importante infiltrado inflamatório de linfócitos T ativados (3, 7). Neste sentido, conforme descrito por Eisenbarth (8), a destruição de células-beta por apoptose é decorrente, em parte, da interação entre as proteínas Fas expressas na superfície das células-beta com as proteínas FasL encontradas na superfície celular das células mononucleares do infiltrado inflamatório nas ilhotas de Langerhans (8, 9).

Marcadores do ataque autoimune contra as células-beta incluem os autoanticorpos contra insulina, ilhotas de Langerhans, descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65), fosfatases de tirosinas (IA-2 e IA2- β) e transportador de zinco específico para as células-beta (ZnT8) (6, 10-12). Um, mas geralmente mais destes autoanticorpos estão presentes em 85-90% dos pacientes no momento do diagnóstico, podendo estar presentes na circulação meses ou anos antes do diagnóstico (6, 11, 12).

Com relação aos engatilhadores ambientais do ataque autoimune contra as células-beta, os principais são: algumas infecções virais, exposição a alguns componentes da dieta durante a infância (por exemplo, compostos do leite de vaca) e toxinas (13, 14). Em uma revisão sistemática de estudos da literatura, Ilonen *et al.* (4) relataram que organismos comensais presentes na microbiota intestinal são importantes fatores para a regulação do sistema imune, podendo afetar negativamente esta regulação, acarretando no desenvolvimento de doenças autoimunes. Lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por espécies de bactérias do gênero *Bacteroides* são encontrados em populações com alta incidência de DM1 e estes LPS têm sido associados com menor tolerância do sistema imune aos autoantígenos (4, 15).

Dados epidemiológicos, clínicos e patológicos demonstram que infecções virais, especialmente as causadas por enterovirose (como coxsackievírus), podem ser um importante fator ambiental desencadeador de DM1, pois a resposta antiviral nestas infecções poderia exacerbar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo na insulite e, conseqüentemente, acarretando na apoptose de células-beta (14). Na fase aguda das infecções por vírus que têm tropismo pelas células-beta, a apoptose destas células ocorre em consequência da liberação de produtos da amplificação viral. Devido a sua baixa capacidade de proliferação, a destruição de células-beta pode ser particularmente deletéria, visto que a taxa de amplificação viral é muito mais elevada que a de replicação de células-beta, acarretando em um processo acelerado de apoptose (14, 16). Além disso, a perda progressiva de células-beta pode ser secundária à ativação de células T CD8⁺ autorreativas (14, 16). A superexpressão do HLA classe I encontrada nas células-beta nestes casos pode ocorrer devido a produção local de interferon tipo I (IFN-I), que leva a ativação de tirosina quinase 2 (TYK2), o que a longo prazo pode ativar a autoimunidade (14). Estudos em camundongos *Non Obese Diabetic* (NOD) demonstraram que a

presença de sorotipos de coxsakievírus CVB1, CVB3 ou CVB4 aceleraram o desenvolvimento de DM1 dependendo da quantidade de células T autorreativas presentes nas ilhotas (17-19).

1.2.1 Genética do Diabetes Mellitus Tipo 1

Estudos recentes de varredura do genoma (*Genome wide association studies* – GWAS) têm associado o DM1 a mais de 60 *loci* genéticos, explicando aproximadamente 80% da herdabilidade desta doença (11, 20-24). Entre esses *loci*, o *locus* do *HLA* de classe II é, sem dúvida, o principal fator de risco genético para o DM1, explicando cerca de 60% do risco, com uma Razão de Chances (RC) > 6,5 (3, 11, 23, 25). Outros genes estão associados com um menor risco (RC < 2,0) para o DM1 quando comparados ao *HLA*, como, por exemplo, os genes *GLIS3* (24, 26) e *ERBB3* (24, 27), conforme demonstrado na **Figura 1**. Entretanto, alguns estudos indicam que a combinação de genótipos *HLA* e polimorfismos de troca única (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) em genes não-*HLA* parece melhorar a predição da doença (3, 11, 20, 28, 29). A investigação de SNPs em genes que regulam o sistema imune tem uma grande importância para uma melhor compreensão da genética do DM1, uma vez que estes genes possuem um papel essencial na patogênese desta doença (3, 4, 10, 11).

Pociot *et al.* (20) utilizaram dados do estudo “*Type 1 Diabetes Genetics Consortium*” (T1DGC) em cálculos de predição do DM1, demonstrando um aumento de 8% na acurácia da predição ao utilizar dados de genótipos de SNPs do *loci* *HLA* concomitantemente a dados de genótipos em SNPs não-*HLA*. Interessantemente, a maioria dos genes candidatos identificados na literatura estão relacionados com a regulação imune ou com a regulação das funções das células-beta (3, 4). Neste contexto,

diversos estudos têm sido focados na identificação de SNPs em genes não-HLA, como por exemplo, SNPs no gene que codifica a *TYK2* (10, 21, 30-37).

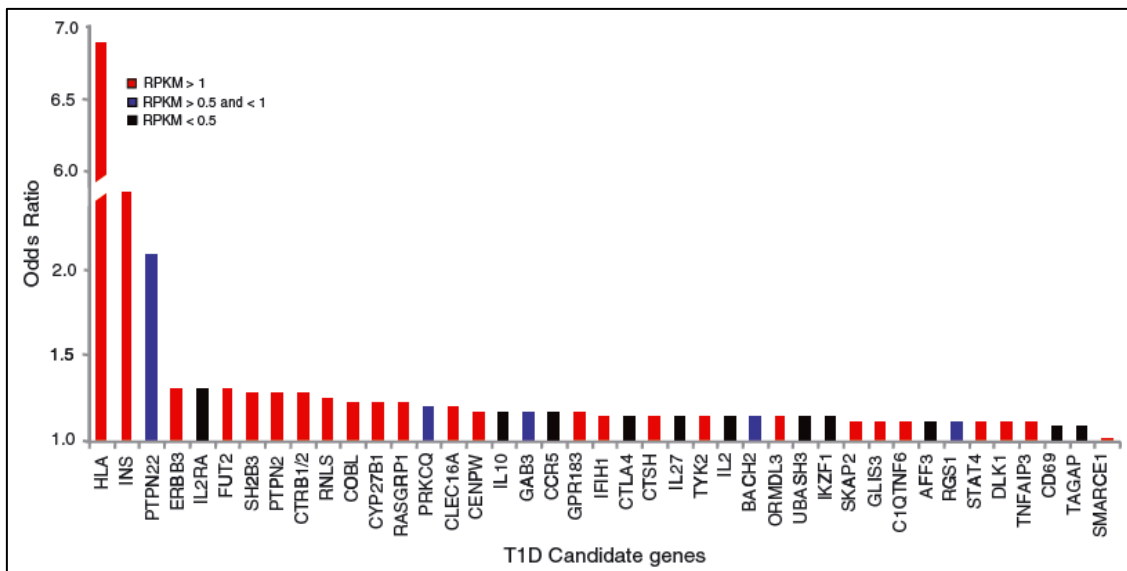


Figura 1. Genes candidatos para o DM1. A figura demonstra os principais genes candidatos para o DM1, de acordo com a expressão gênica respectiva a cada gene e a razão de chances apresentada. Genes expressos no pâncreas são apresentados em barras na cor azul (RPKM > 0,5 - 1, indicando expressão baixa) ou vermelho (RPKM > 1, indicando expressão média ou alta); as barras pretas representam genes não expressos no pâncreas. Retirado e adaptado de Santin *et al.* (24).

1.3 Tirosina Quinase 2 (TYK2)

O gene *TYK2* contém 25 éxons distribuídos em 27,9 kb no cromossomo 19p13.2 (33) e é diferencialmente expresso em vários tipos celulares, como células do sistema imune, células renais, células-beta pancreáticas e da medula óssea (38). A enzima TYK2 possui um papel fundamental em diversas células do sistema imune, incluindo células *natural killer* (NK), CD e células T auxiliares, pois é capaz de modular diversos tipos de respostas, incluindo respostas antivirais (7, 14, 35). O estudo *Immunologic Genome Project* (39) teve como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados a regulação do

sistema imune em células do sistema imune de ratos, incluindo a linhagem de CD. Com relação à expressão de *Tyk2* em CD de ratos, foi verificado um aumento na sua expressão em todos os precursores e nas próprias CD (7). Além disso, as células que apresentaram a expressão mais aumentada de *Tyk2* foram os linfócitos T CD8⁺, sendo estas importantes mediadoras da apoptose de células-beta, mediando também respostas antivirais (7, 39).

A TYK2 é uma enzima pertencente à família das Janus quinases (JAKs) (40) e possui um papel fundamental nas vias de sinalização de diversas citocinas, como por exemplo o IFN-I e interleucinas, além de hormônios como hemopoetina, hormônio do crescimento e leptina, controlando assim diversas funções biológicas (40-42). As enzimas da família JAK funcionam como sinalizadores de componentes citoplasmáticos, uma vez que se encontram associados à subunidade intracelular dos receptores de citocinas de classe I e II (43). A associação da TYK2 aos receptores é facilitada devido aos domínios conservados FERM e SH2, os quais são mediadores de interações peptídicas (43). Além disso, o domínio C-terminal da enzima garante a especificidade da fosforilação, pois é responsável pela atividade de transferência de grupamento fosfato entre as moléculas (40).

Conforme a **Figura 2**, quando ocorre a interação de IFN α com o seu receptor (IFNAR1), a TYK2 sofre transautofosforilação, sendo ativada (44-46). Uma vez ativada, a TYK2 promove a fosforilação de fatores de transcrição Sinais de Transdução e Ativadores de Transcrição (*signal transducers and activators of transcription* - STATs) (44-46). Os homodímeros ou heterodímeros de STATs sofrem translocação para o interior do núcleo, induzindo a transcrição de genes alvo, elevando a expressão de diversos tipos de citocinas, como IFN α e CXCL10 (44-46). Sendo assim, o *TYK2* pode ser um importante gene alvo para o DM1, pois é um gene importante na regulação de respostas antivirais e apoptóticas (14).

Além disso, a TYK2 é uma enzima associada a várias doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla (EM), artrite reumatoide (AR), além do DM1, uma vez que sinalizações mediadas via TYK2 podem acarretar na produção de componentes associados à autoimunidade, implicando na patogênese destas doenças (14, 33, 35, 38, 47, 48). No contexto da EM, Mazdeh *et al.* (41) realizaram tratamentos em pacientes com esta doença com interferon- β (IFN- β) e inibidores de TYK2, demonstrando que a inibição da TYK2 promoveu uma diminuição de respostas inflamatórias em pacientes com EM.

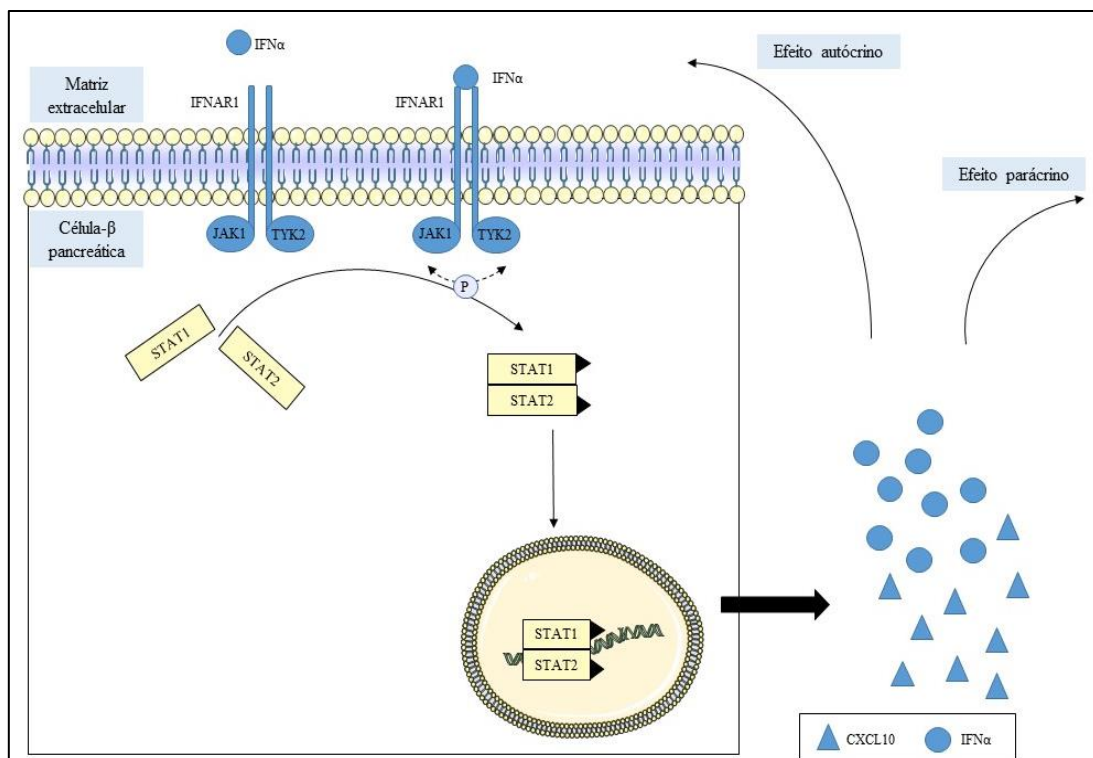


Figura 2. Mecanismo de ativação da TYK2 na célula-beta pancreática. Adaptado de Marroqui *et al.* (45) e Marroqui *et al.* (46).

Além disso, Marroqui *et al.* (45) demonstraram que a inibição de *TYK2* em células-beta expostas ao ácido *polyinosinicpolycitidic* (PIC), um mímico sintético de DNA dupla fita gerado durante a replicação viral, diminuiu a sinalização do IFN-I/STAT. Células com *TYK2* bloqueado tiveram menos expressão de *HLA-I*, um marcador precoce de

inflamação nas células-beta. Além disso, a inibição de *TYK2* preveniu a apoptose das células-beta, sugerindo que o *TYK2* regula rotas apoptóticas e pró-inflamatórias nessas células via modulação de quimiocinas, tais como a CXCL10, que são importantes para o recrutamento dos linfócitos T às ilhotas pancreáticas (45). Outro estudo que mostra o importante papel da *TYK2* na regulação do sistema imune é o de Izumi *et al.* (49), o qual demonstrou que a diminuição da expressão de *Tyk2* em células-beta de camundongos C57BL6, devido a uma mutação natural, foi responsável pela suscetibilidade ao desenvolvimento de DM1 induzido por infecção viral.

1.3.1 Polimorfismos no Gene *Tirosina Quinase 2*

O SNP no gene *TYK2* mais associado a doenças autoimunes, incluindo o DM1, é o rs2304256 (C/A) (32-34, 36, 37, 50). Este SNP está localizado no éxon 8 (**Figura 3**) do gene *TYK2* e é causado por uma mutação missense que causa a substituição de uma valina por uma fenilalanina na posição 362 da região JAK-homóloga 4 (JH4) do gene (33, 48). Essa região é crítica para a interação entre a *TYK2* e o *IFNAR1*, bem como para preservar a expressão do *IFNAR1* nas membranas celulares (51, 52). Para avaliar a associação do SNP rs2304256 e o DM1, Wallace *et al.* (48) genotiparam o SNP rs2304256 em 8290 pacientes com DM1 e 10061 controles sem essa doença de uma população Inglesa, demonstrando a associação do alelo A com proteção para o DM1 (RC 0,86; 95% IC 0,82 – 0,90; $p = 1,43 \times 10^{-10}$) (48). No entanto, um estudo realizado em uma população Japonesa obteve resultados inconclusivos (53).

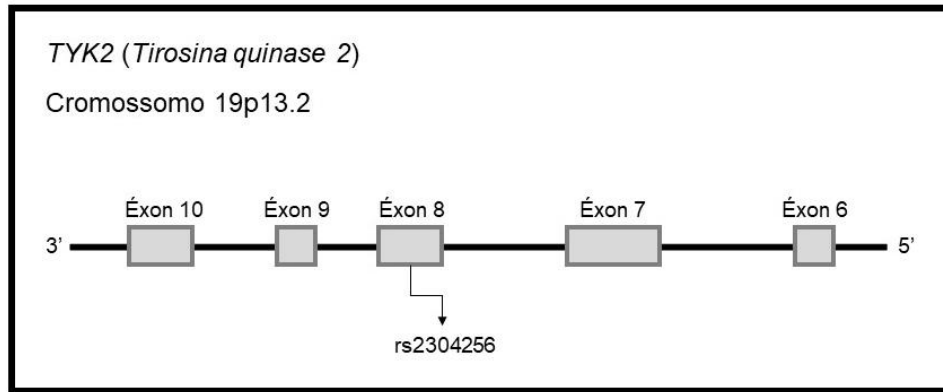


Figura 3. Localização do SNP rs2304256 (C/A) no gene *TYK2*. Este SNP ocorre no sentido anti-senso da fita de DNA no cromossomo 19p13.2. Elaborado pelo autor.

Com relação a outras doenças autoimunes, Tao *et al.* (33) realizaram uma meta-análise que incluiu um total de 21497 casos e 22647 controles de 11 estudos que avaliaram a associação do SNP rs2304256 com doenças como LES, AR, doença de Crohn (DoC) e colite ulcerativa (CoU). Os dados da meta-análise mostraram uma associação do alelo A deste SNP com proteção para todas as doenças autoimunes investigadas. Essa associação se manteve em todos os modelos de herança genética testados, sendo que o modelo alélico foi o mais significativo (RC 0,78; 95% IC 0,70 – 0,87), conforme mostrado na **Figura 4** (33). Os dados dessa meta-análise corroboram com os dados obtidos em outra meta-análise realizada por Lee *et al.* (54). Este estudo incluiu 12 estudos e um total de 16335 casos e 30065 controles, sendo que os casos apresentavam alguma doença reumática, como LES e AR. O alelo A do SNP rs2304256 foi associado com proteção para as doenças reumáticas estudadas (RC= 0,88, IC 95% 0,80 – 0,98) (54). Além disso, Can *et al.* (55) identificaram uma associação entre o genótipo C/C do SNP rs2304256 com risco para DoC e CoU em pacientes turcos. Em contraste, o alelo A foi associado com proteção contra essas doenças (55).

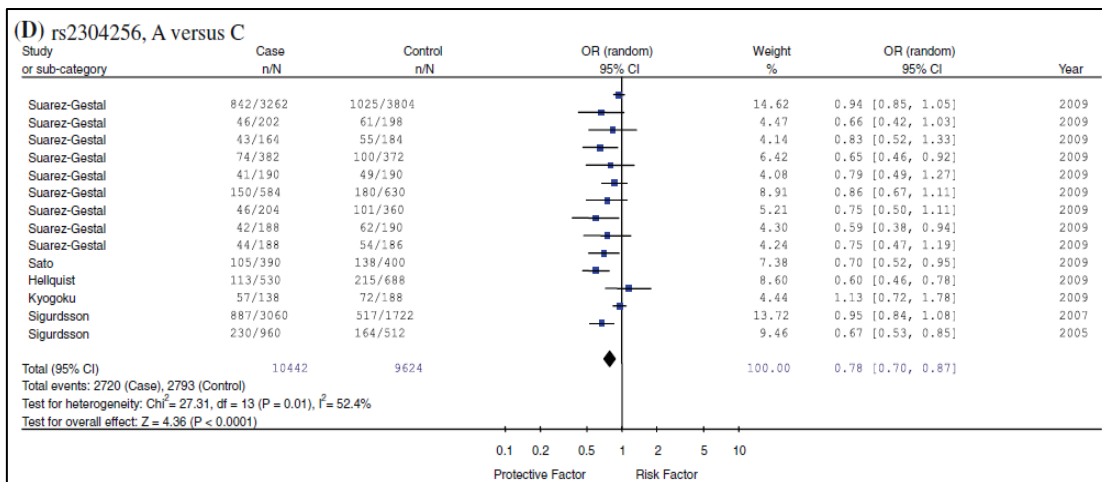


Figura 4. *Forest Plot* mostrando o resultado da meta-análise que investigou a associação entre doenças autoimunes e o alelo A do SNP rs2304256 (C/A) no gene *TYK2*. Retirado e adaptado de Tao *et al.* (33).

Utilizando variáveis do banco de dados *Genotype-Tissue Expression*, Nyaga *et al.* (56) realizaram análises de bioinformática integrando dados de variantes genéticas, organização do genoma e análises funcionais. As análises de predição mostraram que o SNP rs2304256 no gene *TYK2* poderia contribuir na patogênese do DM1 através da *cis*-regulação de genes da rota de sinalização do IFN-I (56). Marroqui *et al.* (45) cultivaram células B linfoblásticas de amostras de 12 indivíduos oriundos do projeto *International HapMap Project*. Destas 12 amostras, 7 indivíduos apresentavam o genótipo C/C do SNP rs2304256 e 5 indivíduos apresentavam o genótipo A/A. Após tratamento com IFN α , as células B linfoblásticas de indivíduos que possuíam o genótipo A/A deste SNP apresentaram menor fosforilação do STAT1 comparado às células de indivíduos com genótipo C/C (45). Assim, os autores sugerem que o genótipo A/A do SNP rs2304256 possui um papel na redução da atividade da enzima *TYK2*, levando a uma redução da resposta inflamatória, consequentemente podendo causar um efeito de proteção para o DM1 (45).

Alguns estudos têm demonstrado a associação de outros SNPs no gene *TYK2* e o DM1 (34, 42, 53, 57). Onengut-Gumuscu *et al.* (57) customizaram um chip para a técnica de *ImmunoChip high-density genotyping assay*, no qual genotiparam 9271 pacientes com DM1 e 12262 controles oriundos de consórcios da União Europeia com o objetivo de identificarem potenciais *loci* de suscetibilidade ao DM1. Os autores demonstraram que os SNPs rs34536443 (G/C) (RC = 0,67; $p = 4,4 \times 10^{-15}$) e rs12720356 (A/C) (RC = 0,82; $p = 3,7 \times 10^{-7}$) foram associados com proteção para o DM1 (57). Os SNPs rs34536446 e rs12720356 também foram associados com proteção para DM1 e AR em uma população da União Europeia (34).

Com relação ao DM1, Nagafuchi *et al.* (53) mostraram a associação de um haplótipo na região promotora do *TYK2* constituído por dois SNPs (-930G > A e -929G > T) com risco para DM1 (RC = 2,4, 95% IC 1,2 – 4,6; $P = 0,010$) em 302 pacientes com DM1 e 331 controles de uma população Japonesa. Além disso, este haplótipo foi associado com uma menor atividade da região promotora e um risco elevado para o DM1 em pacientes que apresentavam infecções virais (“*flu-like syndrome*”) (RC = 3,6, IC 95% 1,5 – 8,5), sugerindo que este haplótipo é um potencial candidato para o DM1 induzido por infecções virais (53).

Neste contexto, os estudos demonstram que o alelo A do SNP rs2304256 tem sido associado com proteção para algumas doenças autoimunes (33, 55); no entanto, até o momento, apenas dois estudos, com dados inconclusivos, investigaram a associação deste SNP com o DM1 (48). Assim, considerando-se a importância do gene *TYK2* na regulação do sistema imune, mais estudos são necessários para avaliar a associação do SNP rs2304256 e o DM1 em outras populações.

1.4 Justificativa

O DM1 é uma doença autoimune complexa que caracteriza um grave problema de saúde pública, uma vez que possui acentuada morbidade e mortalidade. As repercussões econômicas e sociais decorrentes do impacto de suas complicações crônicas são altas e comprometem a qualidade de vida e a produtividade dos indivíduos afetados, além de possuir elevados custos para seu tratamento. Sendo assim, a elucidação das bases genéticas e moleculares do DM1 poderá levar à identificação de pacientes que apresentam maior predisposição para o seu desenvolvimento ou um pior prognóstico. Alguns estudos demonstram a importância da execução de estudos que avaliem a interação entre SNPs do *loci* HLA com SNPs não-HLA em pacientes com DM1, pois podem melhorar a predição da doença.

A super-expressão de HLA classe I, concomitante ao estresse do retículo endoplasmático (RE) e à apoptose de células-beta pancreáticas são características do início do desenvolvimento de DM1. Sabe-se que o IFN α está diretamente associado à ativação de todos esses mecanismos. A TYK2 tem um papel importante na modulação da resposta ao IFN α e ativação de STATs, levando a uma maior resposta autoimune após infecção viral e, conseqüentemente, podendo estar envolvida na suscetibilidade ao DM1. O SNP rs2304256 parece diminuir a função do gene *TYK2* por estar envolvido em uma região crítica para a interação entre a TYK2 e o IFNAR1 e já foi associado com proteção para outras doenças autoimunes. Entretanto, até o momento, apenas dois estudos avaliaram a associação entre esse polimorfismo e suscetibilidade ao DM1 e os resultados ainda são inconclusivos.

2. OBJETIVOS

- Objetivo geral:

- Avaliar a associação entre o SNP rs2304256 no gene *TYK2* e o DM1.

- Objetivos específicos:

- Comparar a frequência do SNP rs2304256 no gene *TYK2* entre pacientes com DM1 (casos) e indivíduos sem DM1 (controles) doadores do banco de sangue, ajustando-se para a presença de haplótipos *HLA-DR/DQ* de alto risco para o DM1.
- Avaliar se o SNP rs2304256 está associado a alguma característica clínica e laboratorial do DM1, como idade de diagnóstico e níveis glicêmicos.

REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Suppl 1):S13-S28.
2. Federation ID. *IDF Diabetes Atlas - 8th edition*. 2017.
3. Redondo MJ, Steck AK, Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2018;19(3):346-53.
4. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2019.
5. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115-33.
6. Pirot P., Cardozo AK, Eizirik DL. Mediators and Mechanisms of Pancreatic Beta-cell Death in Type 1 Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008(52/2):156-65.
7. Hotta-Iwamura C, Tarbell KV. Type 1 diabetes genetic susceptibility and dendritic cell function: potential targets for treatment. *J Leukoc Biol*. 2016;100(1):65-80.
8. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314(21):1360-8.
9. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*. 2001;358(9277):221-9.
10. Robertson CC, Rich SS. Genetics of type 1 diabetes. *Curr Opin Genet Dev*. 2018;50:7-16.
11. Nyaga DM, Vickers MH, Jefferies C, Perry JK, O'Sullivan JM. The genetic architecture of type 1 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;477:70-80.
12. Eisenbarth GS, Jeffrey J. The natural history of type 1A diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(2):146-55.
13. Boucas AP, Oliveira Fdos S, Canani LH, Crispim D. The role of interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) in the development of type 1 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(9):667-76.
14. Op de Beeck A, Eizirik DL. Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the beta cells? *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(5):263-73.
15. Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, Yassour M, et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell*. 2016;165(6):1551.
16. Filippi CM, Estes EA, Oldham JE, von Herrath MG. Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1515-23.
17. Drescher KM, Kono K, Bopegamage S, Carson SD, Tracy S. Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection. *Virology*. 2004;329(2):381-94.
18. Serreze DV, Wasserfall C, Ottendorfer EW, Stalvey M, Pierce MA, Gauntt C, et al. Diabetes acceleration or prevention by a coxsackievirus B4 infection: critical requirements for both interleukin-4 and gamma interferon. *J Virol*. 2005;79(2):1045-52.
19. Larsson PG, Lakshmikanth T, Laitinen OH, Utorova R, Jacobson S, Oikarinen M, et al. A preclinical study on the efficacy and safety of a new vaccine against Coxsackievirus B1 reveals no risk for accelerated diabetes development in mouse models. *Diabetologia*. 2015;58(2):346-54.
20. Pociot F, Lernmark A. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016;387(10035):2331-9.

21. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2009;41(6):703-7.
22. Nguyen C, Varney MD, Harrison LC, Morahan G. Definition of high-risk type 1 diabetes HLA-DR and HLA-DQ types using only three single nucleotide polymorphisms. *Diabetes.* 2013;62(6):2135-40.
23. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem.* 2011;57(2):176-85.
24. Santin I, Eizirik DL. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and beta-cell apoptosis. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15 Suppl 3:71-81.
25. Noble JA, Erlich HA. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(1):a007732.
26. Duarte GCK, Assmann TS, Dieter C, de Souza BM, Crispim D. GLIS3 rs7020673 and rs10758593 polymorphisms interact in the susceptibility for type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 2017;54(9):813-21.
27. Lemos NE, Dieter C, Dorfman LE, Assmann TS, Duarte GCK, Canani LH, et al. The rs2292239 polymorphism in ERBB3 gene is associated with risk for type 1 diabetes mellitus in a Brazilian population. *Gene.* 2018;644:122-8.
28. Winkler C, Krumsiek J, Buettner F, Angermuller C, Giannopoulou EZ, Theis FJ, et al. Feature ranking of type 1 diabetes susceptibility genes improves prediction of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2014;57(12):2521-9.
29. Redondo MJ, Oram RA, Steck AK. Genetic Risk Scores for Type 1 Diabetes Prediction and Diagnosis. *Curr Diab Rep.* 2017;17(12):129.
30. Gutierrez-Roelens I, Lauwerys BR. Genetic susceptibility to autoimmune disorders: clues from gene association and gene expression studies. *Curr Mol Med.* 2008;8(6):551-61.
31. Odhams CA, Cunninghame Graham DS, Vyse TJ. Profiling RNA-Seq at multiple resolutions markedly increases the number of causal eQTLs in autoimmune disease. *PLoS Genet.* 2017;13(10):e1007071.
32. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut.* 2011;60(12):1739-53.
33. Tao JH, Zou YF, Feng XL, Li J, Wang F, Pan FM, et al. Meta-analysis of TYK2 gene polymorphisms association with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases. *Mol Biol Rep.* 2011;38(7):4663-72.
34. Westra HJ, Martinez-Bonet M, Onengut-Gumuscu S, Lee A, Luo Y, Teslovich N, et al. Fine-mapping and functional studies highlight potential causal variants for rheumatoid arthritis and type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2018;50(10):1366-74.
35. Liang Y, Zhu Y, Xia Y, Peng H, Yang XK, Liu YY, et al. Therapeutic potential of tyrosine kinase 2 in autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18(5):571-80.
36. Dendrou CA, Cortes A, Shipman L, Evans HG, Attfield KE, Jostins L, et al. Resolving TYK2 locus genotype-to-phenotype differences in autoimmunity. *Sci Transl Med.* 2016;8(363):363ra149.
37. Ellinghaus D, Jostins L, Spain SL, Cortes A, Bethune J, Han B, et al. Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nat Genet.* 2016;48(5):510-8.
38. Strobl B, Stoiber D, Sexl V, Mueller M. Tyrosine kinase 2 (TYK2) in cytokine signalling and host immunity. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011;16:3214-32.
39. Heng TS, Painter MW, Immunological Genome Project C. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol.* 2008;9(10):1091-4.

40. Hubbard SR. Mechanistic Insights into Regulation of JAK2 Tyrosine Kinase. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:361.
41. Mazdeh M, Moradi N, Khoshroo E, Shayesteh Z, Taheri M, Sayad A, et al. Down-regulation of TYK2, CBLB and LMP7 genes expression in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *J Neuroimmunol*. 2018;314:24-9.
42. Mine K, Hirakawa K, Kondo S, Minami M, Okada A, Tsutsu N, et al. Subtyping of Type 1 Diabetes as Classified by Anti-GAD Antibody, IgE Levels, and Tyrosine kinase 2 (TYK2) Promoter Variant in the Japanese. *EBioMedicine*. 2017;23:46-51.
43. Ferrao R, Lupardus PJ. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK-Receptor Interactions. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:71.
44. Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J*. 2014;462(1):1-13.
45. Marroqui L, Dos Santos RS, Floyel T, Grieco FA, Santin I, Op de Beeck A, et al. TYK2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Apoptosis and the Innate Immune Response in Human Pancreatic beta-Cells. *Diabetes*. 2015;64(11):3808-17.
46. Marroqui L, Dos Santos RS, Op de Beeck A, Coomans de Brachene A, Marselli L, Marchetti P, et al. Interferon-alpha mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(4):656-67.
47. Gutierrez-Roelens I, Lauwerys BR. Genetic Susceptibility to Autoimmune Disorders: Clues from Gene Association and Gene Expression Studies. *Current Molecular Medicine*. 2008;8:551-61.
48. Wallace C, Smyth DJ, Maisuria-Armer M, Walker NM, Todd JA, Clayton DG. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2010;42(1):68-71.
49. Izumi K, Mine K, Inoue Y, Teshima M, Ogawa S, Kai Y, et al. Reduced Tyk2 gene expression in beta-cells due to natural mutation determines susceptibility to virus-induced diabetes. *Nat Commun*. 2015;6:6748.
50. International Multiple Sclerosis Genetics C, Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempinen A, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2013;45(11):1353-60.
51. Richter MF, Dumenil G, Uze G, Fellous M, Pellegrini S. Specific contribution of Tyk2 JH regions to the binding and the expression of the interferon alpha/beta receptor component IFNAR1. *J Biol Chem*. 1998;273(38):24723-9.
52. Ragimbeau J, Dondi E, Alcover A, Eid P, Uze G, Pellegrini S. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *EMBO J*. 2003;22(3):537-47.
53. Nagafuchi S, Kamada-Hibio Y, Hirakawa K, Tsutsu N, Minami M, Okada A, et al. TYK2 Promoter Variant and Diabetes Mellitus in the Japanese. *EBioMedicine*. 2015;2(7):744-9.
54. Lee YH, Bae SC. Association between TYK2 polymorphisms and susceptibility to autoimmune rheumatic diseases: a meta-analysis. *Lupus*. 2016;25(12):1307-14.
55. Can G, Tezel A, Gurkan H, Can H, Yilmaz B, Unsal G, et al. Tyrosine kinase-2 gene polymorphisms are associated with ulcerative colitis and Crohn's disease in Turkish Population. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(4):489-98.
56. Nyaga DM, Vickers MH, Jefferies C, Perry JK, O'Sullivan JM. Type 1 Diabetes Mellitus-Associated Genetic Variants Contribute to Overlapping Immune Regulatory Networks. *Front Genet*. 2018;9:535.
57. Onengut-Gumuscu S, Chen WM, Burren O, Cooper NJ, Quinlan AR, Mychaleckyj JC, et al. Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence

for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers. *Nat Genet.* 2015;47(4):381-6.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO ORIGINAL:

The rs2304256 polymorphism in *TYK2* gene is associated with protection against type 1 diabetes mellitus in a Brazilian population

The rs2304256 polymorphism in the *TYK2* gene is associated with protection against type 1 diabetes mellitus in a Brazilian population

Felipe Mateus Pellenz^{1,2}, Cristine Dieter^{1,2}, Guilherme Coutinho Kullmann Duarte^{1,2},
Luís Henrique Canani^{1,2}, Bianca Marmontel de Souza^{1,2}, Daisy Crispim*^{1,2}

1 – Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 – Post-graduate Program in Medical Sciences: Endocrinology, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Running title: *TYK2* polymorphism and T1DM

Keywords: *TYK2* gene; genetic polymorphism; type 1 diabetes mellitus

* **Corresponding author:** Dr. Daisy Crispim. Rua Ramiro Barcelos 2350; prédio 12; 4º andar. Zip Code 90035-003. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: dcmoreira@hcpa.edu.br

ABSTRACT

Introduction: *Tyrosine kinase 2 (TYK2)* is a putative candidate gene for type 1 diabetes mellitus (T1DM) since it plays an important role in regulating apoptotic and pro-inflammatory pathways in pancreatic beta-cells through modulation of the type I interferon signaling pathway. Accordingly, the rs2304256 single nucleotide polymorphism (SNP) in the *TYK2* gene has been associated with protection for different autoimmune diseases. However, to date, only two studies have evaluated the association between this polymorphism and T1DM, with discordant results.

Aim: To investigate the association between the rs2304256 SNP in the *TYK2* gene and T1DM in a Brazilian population of mixed ethnicity.

Methods: This case-control study comprised 478 patients with T1DM and 518 non-diabetic subjects from Southern Brazil. The rs2304256 (C/A) SNP was genotyped by allele discrimination-real time PCR technique using TaqMan MGB probes.

Results: Genotype and allele frequencies of the rs2304256 SNP differed between T1DM patients and non-diabetic subjects ($P < 0.0001$ and $P = 0.001$, respectively). Furthermore, the A allele was associated with protection against T1DM under both recessive (OR = 0.482, 95% CI 0.288 – 0.806) and additive (0.470, 95% CI 0.278 – 0.794) inheritance models, and adjusting for *HLA DR/DQ* genotypes associated with high-risk for T1DM, gender, and ethnicity.

Conclusions: Our results demonstrated that the A/A genotype of *TYK2* rs2304256 SNP is associated with protection for T1DM in a Brazilian population.

INTRODUCTION

Chronic hyperglycemia in type 1 diabetes mellitus (T1DM) is caused by the severe autoimmune destruction of pancreatic beta-cells by macrophages and T lymphocytes, which renders subjects insulin-dependent for life (1). The autoimmunity against beta-cells occurs in the context of a dialog between invading immune cells and the target beta-cells, and it is triggered by a multifaceted interaction between several genetic and environmental risk factors (1-3). To date, genome wide association studies (GWAS) have identified more than 60 loci associated with T1DM, with the human leukocyte antigen (*HLA*) class II (DR/DQ) region showing the greatest impact on T1DM susceptibility with an odds ratio (OR) > 7 (2, 4, 5). Although single nucleotide polymorphisms (SNPs) in other loci confer modest risks (OR < 2) for T1DM, studies have suggested that the combination of *HLA* genotypes with non-*HLA* SNPs may help disease prediction (5-7).

Beta-cells express 80% of T1DM candidate genes (8-10), which may contribute to T1DM pathogenesis by regulating important pathways in these cells, such as activation of apoptosis, antiviral activity and innate immunity, involving RIG-like receptors and regulators of type I interferons (IFN-I) (8, 11). Tyrosine kinase 2 (*TYK2*) is a T1DM candidate gene that encodes a member of the Janus Kinase (JAK) family of tyrosine kinases, which play a key role in the intracellular signaling of several cytokines and IFN-I.

TYK2 is bound to the IFN-I receptor (IFNAR1) on cell surface in its inactive form. After IFN- α binding to the IFNAR1, *TYK2* and JAK1 are activated, leading to recruitment and phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT) 1 and 2. STAT1/2 heterodimers translocate to the nucleus, where they regulate the expression of IFN-stimulated genes (8, 11-13). In beta-cells, *TYK2* seems to activate

apoptotic and pro-inflammatory pathways via modulation of IFN-I signaling after a viral infection (8). Interestingly, the study performed by Izumi *et al.*, 2015 (14) in C57BL/6 mice carrying a mutant promoter haplotype (containing 11 mutations) in *Tyk2* gene demonstrated that this haplotype was associated with the susceptibility for T1DM induced by viral infection (14).

Accordingly, SNPs in the *TYK2* gene have been associated with protection against autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE), ulcerative colitis (UC), Crohn's disease (CD), multiple sclerosis (MS), and rheumatic arthritis (RA) (15-17). The minor A allele of the rs2304256 SNP in the *TYK2* gene was also associated with protection against T1DM (18). Importantly, this missense SNP (C/A; Val362Phe) in exon 8 of the *TYK2* seems to be functional since B lymphoblastoid cells (BLCLs) obtained from subjects with the A/A genotype showed less marked IFN- α -induced STAT1 phosphorylation compared to cells from subjects with the C/C genotype (8). Another study performed in a Japanese population was not able to confirm this association (19). To our knowledge, no other study has evaluated the association between this SNP and T1DM susceptibility. Thus, here, we investigated the association between the rs2304256 SNP in the *TYK2* gene and T1DM in a Southern Brazilian population of mixed ethnicity.

MATERIALS AND METHODS

Case and control samples, phenotype measurements and laboratory analyses

This case-control study was designed and performed following the STROBE and STREGA guidelines (20, 21). The case group consisted of 478 T1DM patients recruited from the outpatient clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). T1DM was diagnosed accordingly to the American Diabetes Association

guidelines (1). The control group comprised 518 non-diabetic blood donors recruited from the same Hospital. Subjects with glycated hemoglobin (HbA1c) levels $\geq 5.7\%$ (1) and/or a familial history of diabetes were excluded from the control sample. The ethnic group was defined based on self-classification.

For the case group, a standard questionnaire was used to collect information regarding age, age at T1DM diagnosis, drug treatment, and ethnicity. All patients underwent complete physical examination and laboratory tests, as previously described by our research group (22, 23). For the control group, we applied a simplified questionnaire to collect information on age, familial history of diabetes or other diseases, current drug treatment, and presence of arterial hypertension. Their weight and height were measured for body mass index (BMI) calculation and serum was collected for HbA1c measurement. From both T1DM and control subjects, peripheral blood was collected for DNA extraction. All patients and non-diabetic subjects gave assent and written informed consent prior to inclusion in the study, and the Ethic Committee in Research at Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the study protocol.

Genotyping of the rs2304256 SNP in the *TYK2* gene

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a standardized salting-out technique (24). The rs2304256 (C/A) SNP in *TYK2* gene was genotyped by allele discrimination-real time PCR technique using a TaqMan SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) specific for this SNP. Real-time PCR reactions were performed in 384-well plates, in a total of 5 μ l volume, using 2 ng of DNA, Mastermix TaqPath ProAmp 1x (Thermo Fischer Scientific) and TaqMan SNP Genotyping Assay 1x. The plates were then placed in the ViiA7 Real-Time PCR System

(Thermo Fischer Scientific) and heated for 10 min at 95 °C, followed by 50 cycles of 95 °C for 15 s and 62 °C for 1 min, accordingly to the manufacturer's suggestion.

Considering that *HLA DR/DQ* genotypes may affect the association between the rs2304256 SNP and T1DM, we also analyzed frequencies of *HLA* high-risk genotypes in all subjects in order to control for a possible association between the *TYK2* SNP and T1DM for the *HLA* genotypes. For this purpose, 3 SNPs (rs3104413, rs2854275, and rs9273363) adjacent to the *HLA class II DR/DQ* region were genotyped in all samples using specific Custom TaqMan Genotyping Assays 40x (Thermo Fischer Scientific), as previously described (25). This method was used considering that Nguyen et al. (26) showed that these SNPs can predict *HLA DR/DQ* genotypes associated with T1DM susceptibility with an accuracy higher than 99%. Thus, using this method, we calculated predicted frequencies of the following *HLA DR/DQ* genotypes: high-risk genotypes (*DR4/DQ8* or *DR3/DR4-DQ-8* or *DR3/DR3*), intermediate-risk genotype (*DR3/DRx*), and low-risk genotypes (*DRx/DRx* or *D4/DQ7*), where x can be different non-risk alleles (26).

Statistical analyses

Allele frequencies were calculated by gene counting and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were analyzed using χ^2 tests. Allele and genotype frequencies were compared between case and control groups with χ^2 tests. Moreover, genotypes were compared between groups under additive, recessive, and dominant inheritance models (27, 28).

Normal distribution of variables was checked using Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Quantitative variables are shown as mean \pm SD while categorical variables are shown as percentage. Clinical and laboratory characteristics were compared between groups using unpaired Student's *t* tests or χ^2 tests, as appropriate. Logistic

regression analyses were used to estimate the OR with 95% CI and P values for the effects of rs2304256 genotypes on T1DM susceptibility, both for genotype frequencies and the different inheritance models, and adjusting for covariates.

The power calculation was performed in the OpenEpi site (www.openepi.com). This study has a power of $\cong 80\%$ ($\alpha = 0.05$) to detect an OR lower than 0.65 (considering that the A allele frequency in controls is 30%). Statistical analyses were performed using the SPSS 18.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA), and P values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Sample description

Clinical and laboratory characteristics of T1DM patients and nondiabetic subjects included in this study are shown in **Table 1**. Body mass index (BMI) and the percentage of males were higher in the control group compared with T1DM patients. Non-white subjects comprised 9.3% of the T1DM group and 11.8% of the control sample ($P = 0.233$). As expected, mean HbA1c levels and frequency of high-risk *HLA DR/DQ* haplotypes were higher in T1DM patients compared with controls. Mean age at T1DM diagnosis was 17.4 ± 9.7 years. Moreover, 59.8% of T1DM patients had diabetic retinopathy (DR) while 40.4% had diabetic kidney disease (DKD). Mean age did not differ between the groups.

Genotype and allele distributions

Table 2 shows genotype and allele frequencies of *TYK2* rs2304256 (C/A) polymorphism in T1DM patients and non-diabetic subjects. Genotypes frequencies of this SNP were not in accordance with those predicted by the Hardy-Weinberg Equilibrium in controls ($P <$

0.001), and were significantly different between T1DM and control groups ($P = 0.001$) (Table 2). Accordingly, the A allele frequency was lower in T1DM patients compared with the control group (23.1% vs. 29.6%; $P = 0.001$). Moreover, the A allele was associated with protection for T1DM under recessive ($P < 0.0001$) and additive ($P < 0.0001$) inheritance models. After adjustment for the presence of high-risk *HLA DR/DQ* genotypes, gender and ethnicity, the A/A genotype remained independently associated with protection for T1DM in both inheritance models (recessive: OR = 0.482, 95% CI 0.288 – 0.806; $P = 0.005$; additive: OR = 0.470, 95% CI 0.278 – 0.794; $P = 0.005$).

Considering that the A allele frequency was increased in white subjects compared with non-white subjects (27.7% vs. 16.6%; $P = 0.0008$), we excluded non-white subjects from the samples in order to confirm that ethnicity was not influenced our results. Considering only white subjects, the A allele frequency remained significantly decreased in T1DM patients compared to control subjects (24.1% vs. 31.2%, $P < 0.0001$).

Table 3 depicts clinical and laboratory characteristics of T1DM patients broken down by the presence of the A/A genotype of the rs2304256 SNP (recessive model: C/C + C/A vs. A/A). Frequencies of gender, high-risk *HLA DR/DQ* genotypes, ethnicity, hypertension, DR and DKD, and mean age, age at diagnosis, HbA1c, and BMI were not significantly different between T1DM patients with A/A genotype and patients carrying the C allele (all P values > 0.05). Of note, the same variables were not significantly different between T1DM patients carrying the A allele (C/A + A/A) and patients with the C/C genotype (data not shown).

DISCUSSION

TYK2 plays an important role in immunity because it encodes a nonreceptor tyrosine kinase that is constitutively expressed across different immune cells and activates dendritic cells to present self-antigens to autoreactive T cells (15, 29). Moreover, *TYK2* has a key role in regulating the intracellular signaling of several cytokines and IFN-I and seems to be involved in beta-cells apoptosis, which are key mechanisms related to T1DM pathogenesis (8). Thus, *TYK2* is a candidate gene for T1DM. Even though the *TYK2* rs2304256 (C/A) SNP has been associated with other autoimmune diseases in different populations (15, 17-19, 30-34), only two studies have evaluated its association with T1DM (18). Thus, here, for the first time, we replicated the association of *TYK2* rs2304256 SNP with T1DM in a Brazilian population of mixed ethnicity, showing that the A/A genotype of this SNP is protective for T1DM.

Our results are in accordance with the study by Wallace *et al.* (18), who evaluated the rs2304256 SNP in 2,686 patients with T1DM and 4,794 non-diabetic controls of European ancestry, showing that the A allele was associated with protection for T1DM (OR = 0.87, 95% CI 0.81 – 0.94). In contrast, a small study that included 244 T1DM patients and 254 non-diabetic controls from a Japanese population was not able to confirm this association (19), which can be explained by different ethnic backgrounds or lack of statistical power. Besides T1DM, the rs2304256 A allele has also been associated with protection for other autoimmune diseases. Tao *et al.* (17) performed a meta-analysis of 11 studies (21,497 cases and 22,647 controls) to confirm the association of a number of *TYK2* SNPs with some autoimmune and inflammatory diseases (SLE, RA, UC, and CD). Their data showed that rs2304256 A allele was associated with protection for these

diseases (OR = 0.69, 95% CI 0.59 – 0.81 for the dominant model of inheritance) (17). The authors speculated that the rs2304256 A allele may reduce TYK2 function, resulting in a decreased susceptibility to autoimmune diseases (17). Another meta-analysis including 12 studies, totalizing 16,335 cases with SLE or RA and 30,065 controls, confirmed that the rs2304256 A allele confers protection against these rheumatic diseases (OR = 0.88, 95% CI 0.80 – 0.98) (16).

TYK2 rs2304256 SNP causes a valine to phenylalanine change at position 362 in the Jak-homology 4 (JH4) region, which is a critical region for interaction with IFNAR1 (8, 35). Although the functional significance of this SNP remains unclear, it may be related to the abnormal downstream regulation of IFN-I pathway (16). Accordingly, Nyaga *et al.* (35) analyzing T1DM-associated SNP-gene pairs using the Genotype-Tissue Expression (GTEx) database and bioinformatics analyses, predicted that the *TYK2* rs2304256 SNP may contribute to T1DM pathogenesis by cis-regulating a number of genes within the IFN-I signaling pathway.

Moreover, Marroqui *et al.* (8) demonstrated that *TYK2* silencing in human beta-cells exposed to polyinosinicpolycytidilic acid (PIC, a mimic of double-stranded RNA produced during viral infection) decreased the IFN-I pathway activation and expression of CXCL10 and MHC class I proteins, a hallmark of early beta-cell inflammation in T1DM. Consequently, *TYK2* inhibition also prevented PIC-induced beta-cell apoptosis (8). Importantly, these authors showed that BLCLs isolated from subjects with the rs2304256 A/A genotype showed a trend for less marked IFN- α -induced STAT1 phosphorylation compared with subjects carrying the C/C genotype (3.5-fold STAT1 phosphorylation *vs.* 5.7-fold increase compared to the basal condition, respectively) (8). Therefore, the authors concluded that protective effect of the A allele against T1DM is

mediated via downregulation of the IFN- α signaling, which will decrease the production of proinflammatory cytokines and inflammation (8).

Besides the rs2304256 SNP, other SNPs in the *TYK2* gene have been associated with T1DM (19, 32, 33). The minor alleles of the rs34536443 (G/C) and rs12720356 (A/C) SNPs were associated with protection against T1DM (OR = 0.67, $P = 4.4 \times 10^{-15}$, and OR = 0.82, $P = 3.7 \times 10^{-7}$, respectively) in samples from different locations in Europe (32). In addition, Nagafuchi *et al.* (19) evaluated different SNPs at the promoter region and exons of the *TYK2* gene in 302 T1DM patients and 331 non-diabetic controls from a Japanese population, and showed that a haplotype constituted by two rare SNPs at the promoter region (-930G/A and -929G/T) conferred risk for T1DM (OR = 2.4, 95% CI 1.2 – 4.6). Interestingly, the *TYK2* haplotype was associated with decreased promoter activity and conferred higher risk for T1DM in those patients with a flu-like syndrome (OR = 3.6, 95% CI 1.5 – 8.5), suggesting that this haplotype is a putative candidate as a virus-induced diabetes susceptibility region in humans (19).

Our results should be interpreted under a few limitations. First, genotype frequencies of the rs2304256 SNP were not in agreement with those predicated by the HWE in the control group. Even though genotyping by real time PCR technique is a reliable technique (36), we checked all genotype data manually to exclude the possibility of genotyping errors and also genotyped 10% of the samples twice. Thus, the possible explanation for the deviation of HWE is that this SNP is associated with protection against T1DM with lower OR and, therefore, could be under selective forces. Second, we cannot exclude the possibility of population stratification bias when analyzing our data, despite the fact that frequencies of the rs2304256 SNP were not statistically different between white and non-white subjects. To exclude this bias, the results were adjusted for ethnicity,

and the exclusion of non-white subjects from the whole sample did not change the observed associations.

In conclusion, the present study indicates that the A/A genotype of rs2304256 SNP in *TYK2* gene is associated with protection against T1DM in a Brazilian population of mixed ethnicity. This association is biologically plausible considering the involvement of *TYK2* in immune system function and in the regulation of inflammation and apoptosis of beta-cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (grant number: 2018-0051), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). D.C. and G.C.K.D. are recipients of scholarships from CNPq. F.M.P., B.M.S and C.D. are recipients of scholarships from CAPES.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

1. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 2019;42(Supplement 1):S13-S28.
2. Redondo MJ, Steck AK, Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2018;19(3):346-53.
3. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(4):219-26.
4. Nyaga DM, Vickers MH, Jefferies C, Perry JK, O'Sullivan JM. The genetic architecture of type 1 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;477:70-80.
5. Pociot F, Lernmark Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*. 2016;387(10035):2331-9.
6. Winkler C, Krumsiek J, Buettner F, Angermuller C, Giannopoulou EZ, Theis FJ, et al. Feature ranking of type 1 diabetes susceptibility genes improves prediction of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2014;57(12):2521-9.
7. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of Type 1 Diabetes. *Clinical Chemistry*. 2011;57(2):176-85.
8. Marroqui L, Santos RS, Fløyel T, Grieco FA, Santin I, de Beeck AO, et al. TYK2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Apoptosis and the Innate Immune Response in Human Pancreatic b-Cells. *Diabetes*. 2015;64:3808-17.
9. Eizirik DL, Sammeth M, Bouckennooghe T, Bottu G, Sisino G, Igoillo-Esteve M, et al. The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002552.
10. Bergholdt R, Brorsson C, Palleja A, Berchtold LA, Floyel T, Bang-Berthelsen CH, et al. Identification of novel type 1 diabetes candidate genes by integrating genome-wide association data, protein-protein interactions, and human pancreatic islet gene expression. *Diabetes*. 2012;61(4):954-62.
11. Santin I, Eizirik DL. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and β -cell apoptosis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2013;15:(Suppl. 3):71-81.
12. Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J*. 2014;462(1):1-13.
13. Strobl B, Stoiber D, Sexl V, Mueller M. Tyrosine kinase 2 (TYK2) in cytokine signalling and host immunity. *Frontiers in Bioscience*. 2016;16:3224-32.
14. Izumi K, Mine K, Inoue Y, Teshima M, Ogawa S, Kai Y, et al. Reduced Tyk2 gene expression in beta-cells due to natural mutation determines susceptibility to virus-induced diabetes. *Nat Commun*. 2015;6:6748.
15. Dendrou CA, Cortes A, Shipman L, Evans HG, Attfield KE, Jostins L, et al. Resolving TYK2 locus genotype-to-phenotype differences in autoimmunity. *Sci Transl Med*. 2016;8(363):363ra149.
16. Lee YH, Bae SC. Association between TYK2 polymorphisms and susceptibility to autoimmune rheumatic diseases: a meta-analysis. *Lupus*. 2016;25:1307-14.
17. Tao JH, Zou YF, Feng XL, Li J, Wang F, Pan FM, et al. Meta-analysis of TYK2 gene polymorphisms association with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases. *Mol Biol Rep*. 2011;38(7):4663-72.
18. Wallace C, Smyth DJ, Maisuria-Armer M, Walker NM, Todd JA, Clayton DG. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2010;42(1):68-71.

19. Nagafuchi S, Kamada-Hibio Y, Hirakawa K, Tsutsu N, Minami M, Okada A, et al. TYK2 Promoter Variant and Diabetes Mellitus in the Japanese. *EBioMedicine*. 2015;2(7):744-9.
20. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gotsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol*. 2008;61(4):344-9.
21. Little J, Higgins JPT, Ioannidis JPA, Moher D, Gagnon F, von Elm E, et al. Strengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA)-an extension of the STROBE statement. *Genetic Epidemiology*. 2009;33(7):581-98.
22. Boucas AP, Brondani LA, Souza BM, Lemos NE, de Oliveira FS, Canani LH, et al. The A allele of the rs1990760 polymorphism in the IFIH1 gene is associated with protection for arterial hypertension in type 1 diabetic patients and with expression of this gene in human mononuclear cells. *PLoS One*. 2013;8(12):e83451.
23. Assmann TS, Brondani Lde A, Bauer AC, Canani LH, Crispim D. Polymorphisms in the TLR3 gene are associated with risk for type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(4):519-27.
24. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*. 1991;19(19).
25. Duarte GCK, Assmann TS, Dieter C, de Souza BM, Crispim D. GLIS3 rs7020673 and rs10758593 polymorphisms interact in the susceptibility for type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2017;54(9):813-21.
26. Nguyen C, Varney MD, Harrison LC, Morahan G. Definition of high-risk type 1 diabetes HLA-DR and HLA-DQ types using only three single nucleotide polymorphisms. *Diabetes*. 2013;62(6):2135-40.
27. Minelli C, Thompson JR, Abrams KR, Thakkinstian A, Attia J. The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. *Int J Epidemiol*. 2005;34(6):1319-28.
28. Zintzaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol*. 2008;61(7):634-45.
29. Guerder S, Joncker N, Mahiddine K, Serre L. Dendritic cells in tolerance and autoimmune diabetes. *Current opinion in immunology*. 2013;25(6):670-5.
30. International Multiple Sclerosis Genetics C, Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2013;45(11):1353-60.
31. Marroqui L, Dos Santos RS, Op de Beeck A, Coomans de Brachene A, Marselli L, Marchetti P, et al. Interferon-alpha mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(4):656-67.
32. Onengut-Gumuscu S, Chen WM, Burren O, Cooper NJ, Quinlan AR, Mychaleckyj JC, et al. Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers. *Nat Genet*. 2015;47(4):381-6.
33. Mine K, Hirakawa K, Kondo S, Minami M, Okada A, Tsutsu N, et al. Subtyping of Type 1 Diabetes as Classified by Anti-GAD Antibody, IgE Levels, and Tyrosine kinase 2 (TYK2) Promoter Variant in the Japanese. *EBioMedicine*. 2017;23:46-51.
34. Westra HJ, Martinez-Bonet M, Onengut-Gumuscu S, Lee A, Luo Y, Teslovich N, et al. Fine-mapping and functional studies highlight potential causal variants for rheumatoid arthritis and type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2018;50(10):1366-74.

35. Nyaga DM, Vickers MH, Jefferies C, Perry JK, O'Sullivan JM. Type 1 Diabetes Mellitus-Associated Genetic Variants Contribute to Overlapping Immune Regulatory Networks. *Front Genet.* 2018;9:535.
36. Matsuda K. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Adv Clin Chem.* 2017;80:45-72.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of T1DM patients (cases) and non-diabetic subjects (controls).

Characteristics	Controls (n = 518)	Cases (n = 478)	P*
Age (years)	39.1 ± 10.0	38.3 ± 12.6	0.296
Gender (% male)	59.1	51.5	0.019
Ethnicity (% non-white)	11.8	9.3	0.233
HbA1c (%)	5.3 ± 0.3	8.7 ± 2.0	<0.0001
High-risk <i>HLA DR/DQ</i> genotypes (%)	17.5	58.0	<0.0001
BMI (kg/m ²)	27.1 ± 4.5	24.4 ± 3.7	<0.0001
Hypertension (%)	-	46.4	-
Age at T1DM diagnosis (years)	-	17.4 ± 9.7	-
Diabetic kidney disease (%)	-	40.4	-
Diabetic retinopathy (%)	-	59.8	-

Data are shown as mean ± SD or %. BMI, body mass index; HbA1c, glycated hemoglobin; High-risk *HLA DR/DQ* genotypes: *DR4/DQ8*, *DR3/DR4-DQ8* or *DR3/DR3*.

*P values were obtained using χ^2 tests or t-tests, as appropriate.

Table 2. Genotype and allele frequencies of *TYK2* rs2304256 polymorphism in T1DM patients and non-diabetic subjects

	Controls (n = 518)	T1DM (n = 478)	* P	Adjusted OR (95% IC) / * P
Genotype				
C/C	282 (54.4)	287 (60.0)	0.001	1
C/A	165 (31.9)	161 (33.7)		0.921 (0.660 – 1.285) / 0.627
A/A	71 (13.7)	30 (6.3)		0.467 (0.275 – 0.794) / 0.005
Allele				
C	0.704	0.769	0.001	-
A	0.296	0.231		
Recessive model				
C/C + C/A	447 (86.3)	448 (93.7)	<0.0001	1
A/A	71 (13.7)	30 (6.3)		0.482 (0.288 – 0.806) / 0.005
Additive model				
C/C	282 (79.9)	287 (90.5)	<0.0001	1
A/A	71 (20.1)	30 (9.5)		0.470 (0.278 – 0.794) / 0.005
Dominant model				
C/C	282 (54.4)	287 (60.0)	0.074	1
C/A + A/A	236 (45.6)	191 (40.0)		0.782 (0.575 – 1.063) / 0.116

Data are shown as number or proportion. *P-value calculated by χ^2 - test. † P-value after adjustment for high-risk HLA DR-DQ haplotypes, gender and ethnicity.

Table 3. Clinical and laboratory characteristics of T1DM patients by the presence of the A/A genotype of the rs2304256 SNP in *TYK2* gene (recessive model).

Characteristics	C/C + C/A (n = 448)	A/A (n = 30)	P*
Age (years)	38.4 ± 12.7	37.6 ± 11.2	0.768
Age at diagnosis (years)	17.3 ± 9.8	18.5 ± 9.9	0.557
Gender (% male)	51.4	53.3	0.983
Ethnicity (% nonwhite)	9.7	3.3	0.405
HbA1c (%)	8.7 ± 2.0	8.6 ± 2.2	0.772
T1DM high-risk HLA DR/DQ haplotypes (%)	57.8	59.3	> 0.999
BMI (kg/m ²)	24.4 ± 3.7	24.6 ± 3.6	0.843
Hypertension (%)	46.1	50.0	0.876
Diabetic Retinopathy (%)	60.2	53.6	0.623
Diabetic Kidney Disease (%)	39.2	56.5	0.254

Data are shown by mean ± standard deviation or % for all characteristics. BMI, body mass index; HbA1c, glycosylated hemoglobin; Risk HLA: (*DR4/DQ8* - *DR3/DR4-DQ8* - *DR3/DR3*) T1DM, type 1 diabetes mellitus. *P values are according to χ^2 test or t-test as appropriate.

CONCLUSÃO

As principais conclusões deste estudo são:

- A frequência do genótipo A/A, bem como o alelo A do SNP rs2304256 no gene *TYK2* foi diminuída em pacientes com DM1 quando comparado aos controles.
- O genótipo A/A se manteve independentemente associado com proteção contra DM1 nos modelos de herança recessivo e aditivo, ajustando-se para HLA de alto-risco para o DM1 (*HLA DR/DQ - DR4/DQ8, DR3/DR4-DQ8 ou DR3/DR*), sexo e etnia.
- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DM1 não diferiram entre os genótipos do polimorfismo de interesse nos diferentes modelos de herança.
- Embora mais estudos sejam necessários para avaliar tanto o efeito do gene *TYK2* quanto do SNP rs2304256 na patogênese do DM1, hipotetizamos que durante infecções virais com tropismo pelas células-beta, uma atividade atenuada da enzima *TYK2*, como parece ocorrer na presença do genótipo A/A do SNP rs2304256, pode levar a uma resposta inflamatória via INF-I reduzida, consequentemente causando um efeito de proteção para o DM1.

Desta forma, a presente dissertação demonstrou que o genótipo A/A do SNP rs2304256 no gene *TYK2* está independentemente associado com proteção para o DM1. Este foi o primeiro estudo a avaliar esta associação em uma população Brasileira.

OUTRAS PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS NO PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO MESTRADO

Além do artigo que faz parte desta dissertação, ao longo do período de mestrado foram desenvolvidos os seguintes manuscritos que estão em fase de finalização:

1. **Pellenz FM**, Dieter C, Lemos NE, Bauer AC, Souza BM, Crispim D. The influence of *TYK2* gene polymorphisms in autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis.

2. Massignam ET, Dieter C, **Pellenz FM**, Assmann TS, Canani LH, Crispim D. rs4636297 (G/A) polymorphism in the *miR-126* gene is associated with protection for diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes mellitus.