

Variantes genéticas do gene *IFITM3* revelam um potencial modificador da gravidade sintomática da gripe

Genetic variants of the *IFITM3* gene reveal a potential modifier of influenza severity

Suzana David^{1,2}, Vanessa Correia³, Liliana Antunes⁴, Ricardo Faria¹, José Ferrão¹, Paula Faustino^{1,5}, Baltazar Nunes⁴, Fernando Maltez⁶, João Lavinha^{1,7}, Helena Rebelo de Andrade^{3,8}

suzana.david@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Centro de Estudos de Ciência Animal. Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(3) Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(4) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(5) Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(6) Serviço de Doenças Infecciosas. Hospital de Curry Cabral, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(7) BiolSI. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(8) Centro de Patogénese Molecular. Unidade de Retrovirus e Infeções Associadas. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

As epidemias de gripe representam um sério problema de saúde pública com elevados custos económicos. Foi sugerido que um dos alelos do gene *IFITM3* (rs12252-C) constitui um importante fator de risco de base populacional para as formas graves da gripe por infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09. Analisámos variantes do *IFITM3* associadas à gravidade da doença em doentes portugueses (n=41). Foram identificados sete SNPs no amplicão de 352bp do *IFITM3* em torno do rs12252. De acordo com HapMap, o SNP rs34481144 pertence ao mesmo bloco de desequilíbrio de ligação (LD) que rs12252, e está em LD com rs6421983. A associação negativa com formas sintomáticas graves em relação a ligeiras observada para o alelo rs34481144-A é sugestiva de um efeito protetor no modelo de hereditariedade dominante. Para além disso, o haplótipo Hap4 com rs34481144-A, e sem o rs12252-C, mostrou estar significativamente associado a gripe sintomaticamente ligeira. Por outro lado, apesar de a um nível de significância limiar, o haplótipo Hap1 com rs34481144-G, sem rs12252-C, mostrou-se associado à gripe com sintomatologia grave. Em comparação com a população portuguesa em geral, foram observadas diferenças significativas nas frequências do alelo possivelmente protetor rs34481144-A no grupo com sintomatologia grave, do Hap1 deletério no grupo com sintomatologia ligeira e do Hap4 protetor no grupo com doença grave. A proporção de casos com sintomas graves que poderiam ser evitados se todos os indivíduos da população apresentassem o alelo protetor rs34481144-A foi estimada em 56% e 64%, respetivamente na população em geral e no grupo de indivíduos com doença ligeira. A implicação destas variantes nos fenótipos da doença necessita de estudos de validação, nomeadamente de natureza funcional.

_Abstract

Influenza epidemics are a serious global public health and economic problem. The *IFITM3* allele (rs12252-C) was suggested as a strong population-based genetic risk factor for severe influenza virus infection by A(H1N1)pdm09. We analyzed *IFITM3* variants for association to influenza severity in Portuguese patients (n=41). Seven SNPs, within the 352bp

IFITM3 amplicon around rs12252, were identified. According to HapMap SNP rs34481144 belongs to the same linkage disequilibrium (LD) block as rs12252, and is in strong LD with rs6421983. A negative association with severe relative to mild disease was observed for allele rs34481144-A, indicating a protective effect under the dominant model. Moreover, haplotype Hap4 with rs34481144-A, not including rs12252-C, was significantly associated to mild influenza. Conversely, although with borderline significance, haplotype Hap1 with rs34481144-G, not including rs12252-C, was associated to severe disease. Moreover, in comparison to the general Portuguese population, statistical significant differences in the frequencies of the protective allele rs34481144-A in the severe disease group, the deleterious Hap1 in the mild disease group and the protective Hap4 in the severe disease group, were observed. The population attributable risk (PAR) for the targeted rs34481144 allele or genotype was of 55.91% and 64.44% in the general population and the mildly infected individuals, respectively. Implication of these variants in disease phenotype needs further validation, namely through functional analysis.

_Introdução

As epidemias de gripe sazonal são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade a nível mundial (1). O seu impacto na saúde global e na economia impulsionaram a pesquisa das bases genéticas da predisposição à gripe.

Em resposta a uma infeção viral aguda, o sistema imunitário do hospedeiro induz a síntese de moléculas antivirais tais como as proteínas transmembranares da família IFITM que estão envolvidas (i) no sequestro viral, (ii) no bloqueio de recetores virais, e (iii) na restrição da endocitose/fusão, podendo assim inibir a

replicação de vários tipos de vírus incluindo o da gripe, um Ortomixovírus (2). No gene de uma dessas proteínas, a *IFITM3*, o alelo C do polimorfismo (SNP) do locus rs12252, foi associado a sintomas graves da gripe causada pelo vírus pandémico A(H1N1)pdm09 em várias populações. Este alelo, raro nas populações com ancestralidade europeia mas muito comum nas populações do Extremo Oriente, poderá representar um fator de risco populacional importante (3-6).

_Objetivo

Investigar a associação do genótipo *IFITM3* na região do SNP rs12252-C com a gravidade sintomática da gripe, causada pelo vírus A(H1N1)pdm09, em doentes da população portuguesa.

_Material e métodos

Sujeitos

Foram selecionados 41 doentes portugueses com infeção confirmada pelo vírus A(H1N1)pdm09 e classificados entre doentes com formas ligeiras da doença recebendo tratamento ambulatorio e doentes com formas graves da doença recorrendo às Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Os critérios de admissão às UCI foram pneumonia ou dispneia. Para efeitos comparativos foram também selecionadas 200 amostras da população geral portuguesa provenientes de uma amostragem de conveniência, do Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (DGH/INSA). As amostras foram anonimizadas antes da investigação.

Genotipagem

A extração do ADN genómico dos pacientes foi efetuada a partir de leucócitos periféricos no MagNA Pure LC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e a partir de exsudados nasais utilizando o kit QIAamp® Viral RNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os primers direto e reverso: 5'- GGAAACTGTTGAGAAACCGAA-3' e 5'- CATACGCACCTTCACGGAGT-3' (4) foram utilizados na amplificação por PCR de um fragmento de 352 pb no primeiro exão do gene *IFITM3* (chr11: 320556 -320907, GRCh38/hg38). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados por eletroforese capilar ABI-3130 XL (Applied Biosystems, MA, EUA).

As sequências foram analisadas com o programa FinchLa™ (Geospiza). Os haplótipos foram reconstruídos a partir dos dados genómicos para os 7 SNPs do amplicão do gene *IFITM3* pelo programa PHASE 2.1 (7,8). A anotação alélica atribuída ao haplótipo (Hap) seguiu a seguinte ordem: (5'>3'): rs34481144 c.-23G>A (5' UTR); rs1136853 c.9C>A (p.His3Gln); SNP codão 11 c.33T>C (p.Pro11Pro); rs12252 c.42T>C (p.Ser14Ser); rs56323507 c.51C>T (p.Pro17Pro); rs56020216 c.60T>C (p.Tyr20Tyr); rs11553885 c.165C>T (p.Pro55Pro).

Estudos de associação

Os estudos de associação genótipo-fenótipo foram efetuados para os indivíduos com formas graves e ligeiras da doença. Apenas foram analisados os SNPs em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e com uma frequência do alelo minoritário (MAF) >5% em ambos os grupos fenotípicos.

A análise estatística foi efetuada em R (<http://www.R-project.org>). Foram utilizados testes do qui-quadrado e exato de Fisher (duas caudas) (no caso de amostras pequenas) para os estudos de associação sob diferentes modelos de hereditariedade. O qui-quadrado também foi utilizado para avaliar os possíveis efeitos de confundimento devidos à idade, sexo e doença crónica.

Os resultados da associação genótipo-fenótipo foram apresentados como a razão das probabilidades complementares (*Odds Ratio*, OR), e o intervalo de confiança (IC) representando o grau de precisão no tamanho do efeito. Devido ao tamanho reduzido da amostra populacional e o baixo nível de penetrância das variantes observadas neste primeiro estudo preliminar, foi considerado justificável um nível de significância de 10%. Neste caso, além do seu nível habitualmente considerado de 95%, o IC de 90% para o OR foi também calculado para efeitos limiares (*borderline*), sugestivos mas não conclusivos. O critério do *False Discovery Rate* (FDR) foi aplicado para reduzir a proporção de falsos positivos devidos à realização de testes múltiplos, apesar de que, considerando a natureza não aleatória na escolha dos loci genéticos, esta correção não seria obrigatória.

A proporção de risco atribuível à população (*Population Attributable Risk*, PAR), foi calculada por: $PAR\% = 100 \times p(1-OR) / [p(1-OR) + 1]$, onde p é a prevalência do alelo em estudo

na população geral (ou no grupo com doença ligeira) e o OR representa uma estimativa do risco relativo de doença grave na população com o alelo (ou o genótipo) em estudo comparada com a população que não apresenta o alelo (ou o genótipo).

_Resultados

Dos sete SNPs detetados no amplicão de 352 pb do *IFITM3* (tabela 1), os estudos de associação genótipo-fenótipo foram efetuados apenas para os SNPs com MAF >5%: rs12252, rs1136853 e rs34481144 (tabela 2). Os resultados evidenciaram um efeito protetor significativo contra as formas graves da gripe para o alelo rs34481144-A no modelo dominante (OR=0,26; IC95% 0,07-0,97) e um efeito significativo limiar *borderline* no modelo sobredominante (OR=0,27; IC90% 0,09-0,82). Estes resultados, não resistiram aos critérios FDR. Comparando a distribuição deste SNP com a população geral, foi observada uma diferença *borderline* significativa na distribuição do alelo rs34481144-A, no grupo de gripe sintomaticamente grave em relação à população geral ($p=0,071$).

Tendo em conta que, a ausência do alelo rs34481144-A se mostrou associada a um risco acrescido de gripe com sintomas graves, foi estimado o PAR, a proporção de graves que poderiam ser evitados se todos os indivíduos da população tivessem o alelo protetor. Pelos nossos resultados, 56% e 64% do risco de infeção com características graves é atribuível à ausência do alelo rs34481144-A, respetivamente na população geral portuguesa e no grupo de doentes com sintomas ligeiros.

De acordo com a nossa análise, os fatores idade e sexo não mostraram associação com o genótipo, assim como o fator doença crónica não mostrou associação com a gravidade sintomática da gripe, razão pela qual não foram considerados em ajustamentos para fatores de confundimento. Nenhuma outra associação significativa foi evidenciada para os outros dois SNPs, apesar de uma tendência observada para o alelo rs12252-C em associação com um risco acrescido de doença grave, tal como previamente descrito para outras populações.

Estudos de associação genótipo-fenótipo foram realizados para os três haplótipos com frequências >5%: Hap1 (GCTTCTC), Hap3 (GATCCTC), Hap4 (ACTTCTC). O Hap1 revelou-se como um fator genético deletério relativo à gripe com sintomas ligeiros (OR=2,41; IC90% 1,14-5,08) (tabela 3), e o Hap4 um fator genético protetor estatisticamente significativo contra a gripe sintomaticamente grave (OR=0,29; IC95% 0,10-0,82) (figura 1 e tabela 3). Para o Hap4, o teste qui-quadrado resistiu ao critério FDR. Em comparação com a população geral portuguesa, a distribuição do Hap1 deletério no grupo de doentes com sintomas de gripe ligeiros foi significativamente diferente do observado na população geral ($p=0,017$) enquanto a distribuição do Hap4 protetor no grupo de doença grave foi significativamente diferente da observada na população geral portuguesa ($p=0,016$).

Os padrões de desequilíbrio de ligação (*Linkage disequilibrium*, LD), das variantes genéticas na região cromossómica em volta do rs34481144, foram visualizados numa população com ancestralidade na Europa do norte e oeste do HapMap, com o programa Haploview (9). Este SNP parece pertencer ao mesmo bloco de LD do rs12252 (figura 2), estando este último em LD perfeito com o rs1136853 ($r^2=1$). O SNP rs34481144 parece estar em LD com o rs6421983 ($r^2=0,88$). A análise de transcrição *in vitro* do *IFITM3* com os haplótipos Hap1 e Hap4, não evidenciou diferenças significativas, mesmo após estímulo por interferão, IFN- α ou IFN- γ (dados não apresentados). A análise *in silico* das variantes intrónicas rs6421983 c.249+171G>A e c.249+171G>C, utilizando o programa *Human Splicing Finder* (10), não revelou alterações potenciais de *splicing*.

Tabela 1: ▾ Frequências alélicas e genótípicas das variantes do *IFITM3* na população geral portuguesa e em doentes portugueses infetados pelo vírus A(H1N1)pdm09

SNP, variante	Genótipo	PGP ^a (n=200)	Doentes portugueses infetados pelo vírus A(H1N1)pdm09 ^a		
			Total (n=41)	Sintomatologia ligeira ^b (n=19)	Sintomatologia grave ^c (n=22)
rs12252 c.42T>C (p.Ser14Ser)	CC	0,00 (0/200)	0,0244 (1/41)	0,0526 (1/19)	0,00 (0/22)
	CT	0,1200 (24/200)	0,1463 (6/41)	0,1053 (2/19)	0,1818 (4/22)
	TT	0,8800 (176/200)	0,8293 (34/41)	0,8421 (16/19)	0,8182 (18/22)
	Alelo C	0,0600 (24/400)	0,0976 (8/82)	0,1053 (4/38)	0,0909 (4/44)
	Alelo T	0,9400 (376/400)	0,9024 (74/82)	0,8947 (34/38)	0,9091 (40/44)
	HWE ^d	0,815	1,170		
rs34481144 c.-23G>A (5' UTR)	AA	0,1100 (22/200)	0,0976 (4/41)	0,1053 (2/19)	0,0909 (2/22)
	AG	0,4450 (89/200)	0,4146 (17/41)	0,5789 (11/19)	0,2727 (6/22)
	GG	0,4450 (89/200)	0,4878 (20/41)	0,3158 (6/19)	0,6364 (14/22)
	Alelo A	0,3325 (133/400)	0,3049 (25/82)	0,3947 (15/38)	0,2273 (10/44)
	Alelo G	0,6675 (267/400)	0,6951 (57/82)	0,6053 (23/38)	0,7727 (34/44)
	HWE ^d	0,001	0,019		
rs1136853 c.9C>A (p.His3Gln)	AA	0,00 (0/200)	0,0244 (1/41)	0,0526 (1/19)	0,00 (0/22)
	AC	0,1050 (21/200)	0,1463 (6/41)	0,1053 (2/19)	0,1818 (4/22)
	CC	0,8950 (179/200)	0,8293 (34/41)	0,8421 (16/19)	0,8182 (18/22)
	Alelo A	0,0525 (21/400)	0,0976 (8/82)	0,1053 (4/38)	0,0909 (4/44)
	Alelo C	0,9475 (379/400)	0,9024 (74/82)	0,8947 (34/38)	0,9091 (40/44)
	HWE ^d	0,614	1,170		
rs11553885 c.165C>T (p.Pro55Pro)	TT	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	TC	0,00 (0/200)	0,0488 (2/41)	0,0526 (1/19)	0,0455 (1/22)
	CC	1,00 (200/200)	0,9512 (39/41)	0,9474 (18/19)	0,9545 (21/22)
	Alelo T	0,00 (0/400)	0,0244 (2/82)	0,0263 (1/38)	0,0227 (1/44)
	Alelo C	1,00 (400/400)	0,9756 (80/82)	0,9737 (37/38)	0,9773 (43/44)
	HWE ^d	NA	0,026		
SNP cd11 c.33T>C (p.Pro11Pro)	CC	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	CT	0,00 (0/200)	0,0244 (1/41)	0,0526 (1/19)	0,00 (0/22)
	TT	1,00 (200/200)	0,9756 (40/41)	0,9474 (18/19)	1,00 (22/22)
	Alelo C	0,00 (0/400)	0,0122 (1/82)	0,0263 (1/38)	0,00 (0/44)
	Alelo T	1,00 (400/400)	0,9878 (81/82)	0,9737 (37/38)	1,00 (44/44)
	HWE ^d	NA	0,006		
rs56323507 c.51C>T (p.Pro17Pro)	TT	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	TC	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	CC	1,00 (200/200)	1,00 (41/41)	1,00 (19/19)	1,00 (22/22)
	Alelo T	0,00 (0/400)	0,00 (0/82)	0,00 (0/38)	0,00 (0/44)
	Alelo C	1,00 (400/400)	1,00 (82/82)	1,00 (38/38)	1,00 (44/44)
	HWE ^d	NA	NA		
rs56020216 c.60T>C (p.Tyr20Tyr)	CC	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	CT	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	TT	1,00 (200/200)	1,00 (41/41)	1,00 (19/19)	1,00 (22/22)
	Alelo C	0,00 (0/400)	0,00 (0/82)	0,00 (0/38)	0,00 (0/44)
	Alelo T	1,00 (400/400)	1,00 (82/82)	1,00 (38/38)	1,00 (44/44)
	HWE ^d	NA	NA		

PGP – População geral portuguesa (este estudo); HWE – equilíbrio de Hardy-Weinberg; NA – variante observada sem frequência ou população (1000 Genomes Project) ⁽¹¹⁾; SNP – Single Nucleotide Polymorphism; cd - codão.

^a Frequência alélica e genotípica documentada a partir do presente estudo; ^b A sintomatologia ligeira corresponde a doentes observados apenas em ambulatório; ^c A sintomatologia grave corresponde a doentes hospitalizados em Unidades de Cuidados Intensivos; ^d Valores do qui-quadrado do HWE para os dados colhidos no presente estudo.

Tabela 2: ↴ Associação dos polimorfismos rs12252, rs1136853 and rs34481144 ao risco acrescido de gripe com sintomatologia grave, sob diferente modelos de hereditariedade.

Modelo genético	SNP	Tabela de contingência			P Qui-quadrado (χ^2)	P Teste exato de Fisher ^a	OR (IC 95%)	
Aditivo	rs12252		CC	CT	TT			Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	0	4	18	NA	0,429	0,00 (0-NaN)
		Sintomas ligeiros da gripe	1	2	16	NA	0,486	0,00 (0-NaN)
	rs1136853		AA	AC	CC			Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	0	4	18	NA	0,429	0,00 (0-NaN)
	Sintomas ligeiros da gripe	1	2	16	NA	0,486	0,00 (0-NaN)	
rs34481144		AA	AG	GG			Heterozigoto	
	Sintomas graves da gripe	2	6	14	NA	0	1,83 (0,20-16,51)	
	Sintomas ligeiros da gripe	2	11	6	NA	0,578	0,43 (0,05-3,79)	
Alélico	rs12252		T	C				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	40	4		NA	1	0,85 (0,20-3,66)
		Sintomas ligeiros da gripe	34	4		NA	1	0,85 (0,20-3,66)
	rs1136853		C	A				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	40	4		0,100	0,149	0,45 (0,17-1,18)
	Sintomas ligeiros da gripe	34	4					
Dominante	rs12252		TT	CC+CT				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	18	4		NA	1	1,19 (0,23-6,12)
		Sintomas ligeiros da gripe	16	3		NA	1	1,19 (0,23-6,12)
	rs1136853		CC	AA+AC				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	18	4		0,041	0,062	0,26 (0,07-0,97) ^b
	Sintomas ligeiros da gripe	16	3					
Recessivo	rs12252		CT+TT	CC				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	22	0		NA	0,463	0 (0-NaN)
		Sintomas ligeiros da gripe	18	1		NA	0,463	0 (0-NaN)
	rs1136853		AC+CC	AA				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	22	0		NA	1	0,85 (0,11-6,70)
	Sintomas ligeiros da gripe	18	1					
Sobredominante	rs12252		CC+TT	CT				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	18	4		NA	0,668	1,89 (0,31-11,68)
		Sintomas ligeiros da gripe	17	2		NA	0,668	1,89 (0,31-11,68)
	rs1136853		AA+CC	AC				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	18	4		0,047	0,062	0,27 (0,07-1,01) ^c
	Sintomas ligeiros da gripe	17	2					
rs34481144		AA+GG	AG				Heterozigoto	
	Sintomas graves da gripe	16	6					
	Sintomas ligeiros da gripe	8	11					

SNP – Single Nucleotide Polymorphism; IC – Intervalo de confiança; OR – Odds Ratio; NA – Não aplicável.

^a O teste exato de Fisher refere-se ao teste com duas caudas; ^b O intervalo de confiança a 90% para um nível de significância de 10% (borderline): OR=0,26; IC90% 0,09-0,79;

^c O intervalo de confiança a 90% para um nível de significância de 10% (borderline): OR=0,27; IC90% 0,09-0,82.

Figura 1: Histograma das frequências dos alelos e haplótipos nos doentes portugueses infetados pelo vírus A(H1N1)pdm09.

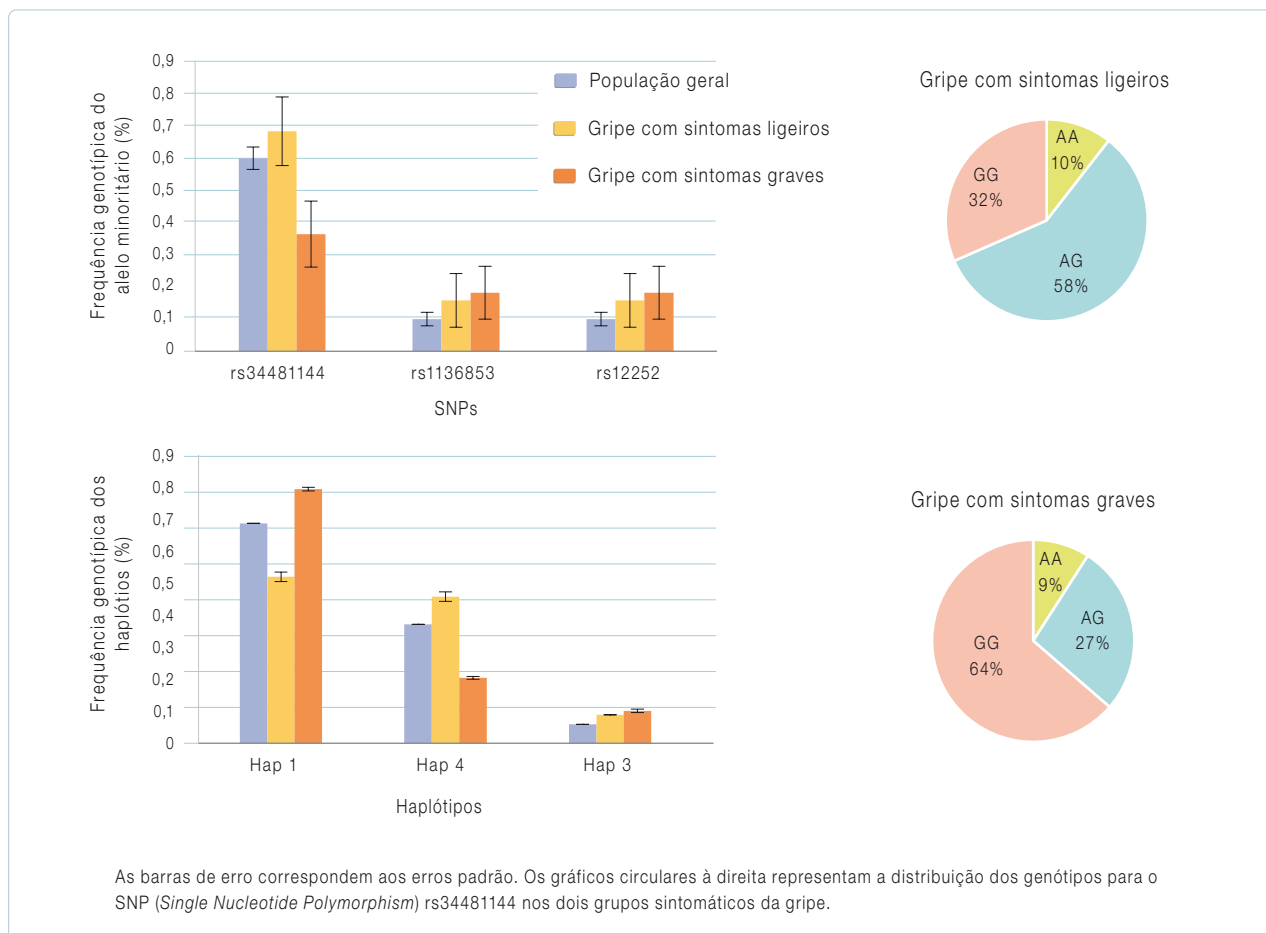


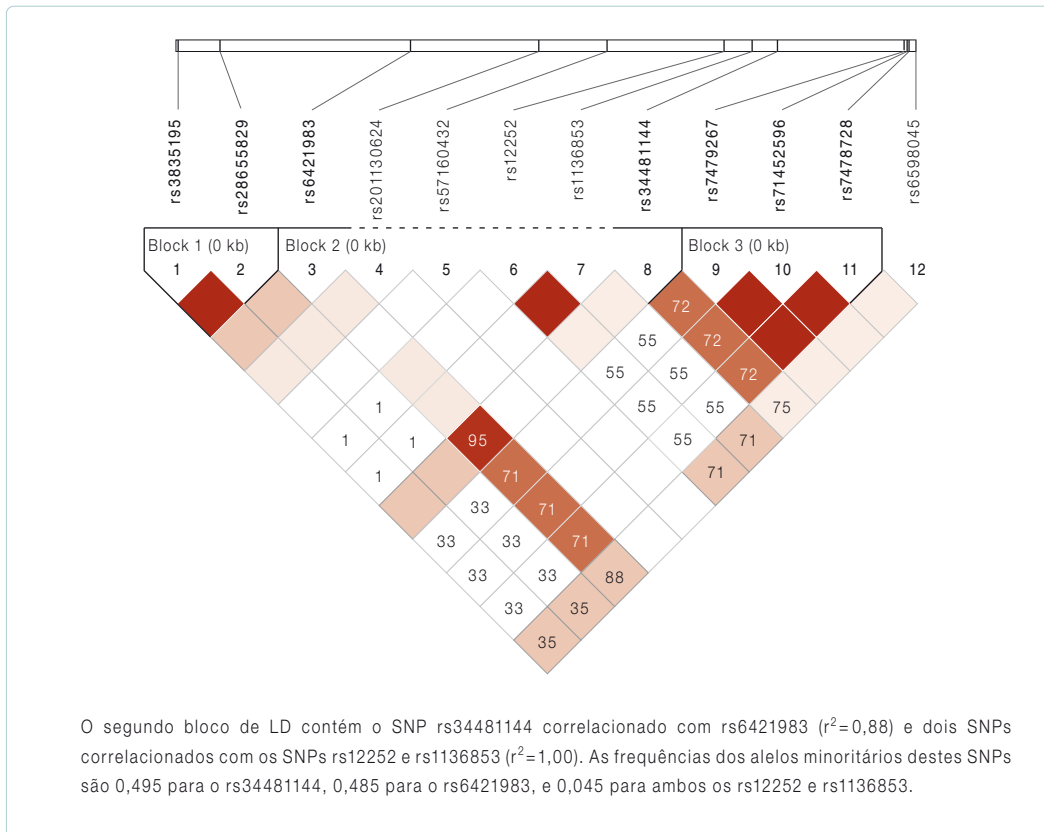
Tabela 3: Associação dos haplótipos maioritários^a ao risco acrescido de gripe com sintomatologia grave.

Tabela de contingência				P Qui-quadrado (χ^2)	P Teste exato de Fisher ^b	OR (IC 95%)
Haplótipo-1	Sintomas graves da gripe	Ausente	Presente	0,051	0,075	2,41 (0,99-5,86) ^c
	Sintomas ligeiros da gripe	16	28			
Haplótipo-3	Sintomas graves da gripe	Ausente	Presente	NA	0,463	0,00 (0,00-NaN)
	Sintomas ligeiros da gripe	22	16			
Haplótipo-4	Sintomas graves da gripe	Ausente	Presente	0,016	0,024	0,29 (0,10-0,82)
	Sintomas ligeiros da gripe	44	0			

IC – Intervalo de confiança; OR – Odds Ratio; NA – Não aplicável.

^a Os haplótipos maioritários são os que apresentam uma frequência > 5% nos grupos populacionais em estudo: população geral portuguesa e doentes infetados pelo vírus A(H1N1) da gripe. Para a definição dos haplótipos ver o corpo do texto; ^b O teste exato de Fisher refere-se ao teste duas caudas; ^c O intervalo de confiança a 90% para um nível de significância de 10% (borderline): OR=2,41; IC90% 1,14-5,08.

Figura 2: Os padrões de desequilíbrio de ligação (LD) na região genómica em torno do rs34481144 segundo o HapMap, visualizados pelo programa Haploview (9) numa população com ancestralidade oriunda da Europa do norte e oeste.



_Conclusões

A pandemia de gripe de 2009 pelo vírus A(H1N1)pdm09 suscitou a estudos de associação da variante do SNP rs12252 do gene *IFITM3* com a gripe sintomaticamente grave. No nosso estudo de associação genética na população portuguesa o alelo rs12252-C não se revelou significativamente associado a doença grave como previamente descrito (3-6). Porém, o alvo do nosso estudo, o SNP rs34481144, localizado no mesmo bloco LD que o rs12252 e em LD com o rs6421983, no seu alelo A parece conferir proteção contra as formas graves de doença.

A análise de associação genótipo-fenótipo, dos haplótipos mais frequentes na população geral portuguesa, revelou uma associação estatisticamente significativa com a doença grave (Hap1) ou ligeira (Hap4), sendo que neste último caso a associação resistiu ao critério FDR (OR=0,29; 95% IC 0,10-0,82). É notável

neste caso, que o Hap inclui o alelo protetor rs34481144-A mas não o alelo de suscetibilidade rs12252-C. Além do mais, os resultados são sugestivos de uma associação do Hap1, que inclui o alelo rs34481144-G mas não o alelo rs12252-C, com a gripe de sintomatologia grave a um nível de significância *borderline* (OR=2,41; 90% IC 1,14-5,08). A associação com a gravidade da doença também foi observada para o SNP rs34481144 onde o alelo minoritário A foi indicativo de um efeito protetor num modelo de hereditariedade dominante (OR=0,26; 95% IC 0,07-0,97). Em conformidade com estes resultados, quando comparadas as frequências dos SNPs e Hap entre os dois grupos de pacientes e a população geral portuguesa, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, nomeadamente a frequência do alelo protetor rs34481144-A no grupo com doença grave foi mais baixa que o previsto pela análise da população geral, a frequência do Hap1 deletério no grupo de doença

ligeira mais baixo que o esperado, e a frequência do Hap4 protetor no grupo de doença grave mais baixo que o observado na população geral portuguesa. A proporção de casos com sintomas graves que poderiam ser evitados se todos os indivíduos da população apresentassem o alelo protetor rs34481144-A foi estimada, respetivamente, em 56% e 64% na população geral e no grupo de indivíduos com doença ligeira.

Os mecanismos genéticos e moleculares das proteínas IFITM que interferem com os ciclos de infeção viral e bacteriana ainda não estão inteiramente elucidados (12,13). No nosso estudo, o SNP rs34481144 no seu alelo G foi associado com formas graves da infeção pelo vírus da gripe. A análise *in vitro* da transcrição dos haplótipos Hap1 e Hap4 mais frequentes do gene *IFITM3* não evidenciou nenhuma diferença significativa, com ou sem estimulação pelo IFN- α ou IFN- γ .

_Conclusões

Estes resultados apontam para diferenças importantes no risco de desenvolver doença grave por infeção pelo vírus da gripe A(H1N1)pdm09 em populações de fundo genético diferente. A confirmação dos nossos resultados em grupos populacionais maiores e em estudos funcionais dos SNPs em LD com o rs34481144 (rs6421983) seria necessária para identificar novos alvos de intervenção no controlo da gripe.

Agradecimentos:

Este estudo foi financiado pela FCT/MEC e cofinanciado pelo FEDER, sob o *Partnership Agreement* PT2020, no projeto UIDMULTI/00211/2013. Agradecemos a assistência clínica das Dras. Madalena Almeida Santos e Maria José Silvestre do Hospital Curry Cabral e o apoio técnico da Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA. Agradecemos à Patrícia Barros, Rafaela Lacerda e Juliane Menezes do DGH/INSA, ao Luís Santos do Departamento de Doenças Infecciosas/INSA, bem como à Stephanie David Bosne pelas discussões proveitosas para a realização deste trabalho. O plasmídeo pGL3-control foi facultado por Peter Jordan, DGH/INSA.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Fact sheet n° 211 - Influenza. [Em linha]. [consult. 23/10/2018]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- (2) Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 2011;472(7344):481-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3409588/>
- (3) Everitt AR, Clare S, Pertel T, et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature*. 2012;484(7395):519-23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648786/>
- (4) Zhang YH, Zhao Y, Li N, et al. Interferon-induced transmembrane protein-3 genetic variant rs12252-C is associated with severe influenza in Chinese individuals. *Nat Commun*. 2013;4:1418. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3562464/>
- (5) Yang X, Tan B, Zhou X, et al. Interferon-inducible transmembrane protein 3 genetic variant rs12252 and influenza susceptibility and severity: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124985. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4420464/>
- (6) Mills TC, Rautanen A, Elliott KS, et al. IFITM3 and susceptibility to respiratory viral infections in the community. *J Infect Dis*. 2014;209(7):1028-31. Epub 2013 Aug 30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/23997235/>
- (7) Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*. 2003;73(5):1162-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1180495/>
- (8) Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):978-89. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1275651/>
- (9) Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5. Epub 2004 Aug 5.
- (10) Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):e67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2685110/>
- (11) 1000 Genomes Project Consortium; Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/23128226/>
- (12) Tartour K, Cimarelli A. Les IFITM, un obstacle commun à de nombreux virus. *Med Sci (Paris)*. 2015;31(4):377-82. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153104011>
- (13) Ranjbar S, Haridas V, Jasenosky LD, et al. A Role for IFITM Proteins in Restriction of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cell Rep*. 2015;13(5):874-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4916766/>