



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Susceptibilidade genética à diabetes mellitus tipo 1: variantes genómicas nas vias de metabolismo da vitamina D**

**Joana Trigo Rodrigues Almeida**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2ºciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos

**Covilhã, Outubro de 2017**

# Agradecimentos

Com a conclusão deste trabalho fecha-se mais um ciclo da minha vida, mas não sem antes agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste estudo e a todos os que me acompanharam durante este ano de aprendizagem.

Começo desde já por agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Manuel Lemos, pela oportunidade de pertencer ao seu grupo de trabalho. Agradeço a disponibilidade e o apoio demonstrados durante o processo de trabalho e agradeço todos os conhecimentos científicos transmitidos.

Ao Serviço de Endocrinologia Diabetes e Metabolismo do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, na pessoa do director de serviço, Doutor Francisco Carrilho e ao Serviço de Endocrinologia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, Aveiro, na pessoa da directora de serviço, Doutora Joana Guimarães pela colaboração essencial no recrutamento de doentes.

Aos Bombeiros Voluntários da Covilhã, na pessoa do Comandante Lucas pela amabilidade de providenciarem o transporte das amostras.

À Catarina Gonçalves por me ter recebido tão bem no laboratório e me ter ensinado e ajudado a dar os primeiros passos como “mini” investigadora. Agradeço a tua simpatia, energia e disponibilidade.

À Eduarda Coutinho por todos os bons momentos no laboratório que tornaram o trabalho mais fácil. Pela constante passagem de conhecimentos e ajuda nos momentos difíceis. Obrigada pela motivação e por todas as conversas.

À minha “tríade familiar” (como diria a minha irmã), agradeço do fundo do coração o vosso amor. A ti Mãe, por todos os esclarecimentos de dúvidas e ajudas mas principalmente obrigada pela tua força e exemplo. A ti Pai, pela confiança que sempre demonstraste em mim e pela tua alegria. Sem o vosso trabalho e dedicação nada disto seria possível. A ti Carolina, por poder contar contigo para tudo. Obrigada pelo o vosso apoio, a vossa alegria e a nossa união durante este ano.

Aos meus amigos e amigas, a todos aqueles que se queixaram vezes infinitas do meu desaparecimento, chegou a altura de vos recompensar com muitas horas extra.

Por último queria deixar o meu agradecimento ao CICS, a todas as pessoas que fazem do CICS o nosso local de trabalho e a todos os colegas de trabalho com quem me fui cruzando. À Sandra Rocha por todos os almoços, cafés e horas partilhadas no laboratório. Ao Sr. Américo por animar as minhas pausas para o café.

# Resumo

A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune que resulta da destruição selectiva das células produtoras de insulina, as células  $\beta$  pancreáticas, em indivíduos geneticamente susceptíveis. A vitamina D (vit D) é a principal responsável pela manutenção dos níveis de cálcio e fosfato e pelo metabolismo ósseo. No entanto, a vit D está também envolvida na modulação da resposta imunitária e tem sido consistentemente associada a doenças autoimunes, como a DM1. Doentes com DM1 apresentam uma maior prevalência de défice de vit D e a suplementação com vit D parece diminuir o risco para DM1, sugerindo uma associação entre a DM1 e a vit D. Os níveis de vit D dependem parcialmente da dieta e da exposição solar mas também de factores genéticos. Os polimorfismos de nucleótido único (SNP's) localizados nas proximidades ou nos genes que codificam enzimas cruciais para a síntese (*DHCR7*-rs12785878), metabolismo (*CYP2R1*-rs2060793) e catabolismo (*CYP24A1*-rs6012897) da vit D, têm mostrado associação com os níveis de vit D e com o risco para a DM1. O objectivo deste estudo foi determinar a associação entre estes 3 SNP's presentes na via de metabolismo da vit D e a susceptibilidade genética para a DM1 na população portuguesa.

Foi desenhado um estudo caso-controlo de modo a analisar a prevalência dos SNP's em 320 doentes DM1 e 486 controlos saudáveis através das técnicas de PCR e de genotipagem por enzimas de restrição. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre doentes e controlos. Paralelamente avaliámos a associação destes polimorfismos com vários parâmetros clínicos da doença.

Os resultados sugerem que o polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793 está associado com um aumento do risco de incidência da DM1. Observámos também uma possível associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento da retinopatia diabética. Quanto ao polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 verificou-se uma possível associação com a idade de diagnóstico e o genótipo heterozigótico parece estar associado com o desenvolvimento de anticorpos anti-GAD65. Detectámos ainda uma tendência de associação entre os SNP's *DHCR7*-rs12785878 e *CYP24A1*-rs6013897 e o género do doente. As descobertas feitas necessitam de ser confirmadas e reavaliadas em novos estudos com populações mais numerosas, no entanto, podem contribuir para uma melhor compreensão da patogénese da DM1 e o papel da vit D na autoimunidade e na susceptibilidade genética para a DM1.

## Palavras chave

Diabetes Mellitus Tipo 1; Vitamina D; Genética; Polimorfismo; Endocrinologia

# Abstract

Type 1 Diabetes (T1D) is an autoimmune disease that results from the selective destruction of insulin producing cells, the pancreatic  $\beta$  cells, in genetic susceptible individuals. Vitamin D (vit D) is the main responsible for the maintenance of calcium and phosphate levels and bone metabolism. However, vit D is also involved in the modulation of the immune response, and has been consistently associated with autoimmune diseases, including T1D. Patients with T1D have a higher prevalence of vit D deficiency and supplementation with vit D seems to reduce the risk for T1D, suggesting an association between T1D and vit D. Serum levels of vit D partly depend on diet and sunlight exposure, however, genetic factors are also involved. Single nucleotide polymorphisms (SNP's) located within or near genes that encode crucial enzymes for the synthesis (*DHCR7*-rs12785878), metabolism (*CYP2R1*-rs2060793) and catabolism (*CYP24A1*-rs6012897) of vit D have been associated with serum levels of vit D and with the risk for T1D. The aim of this study was to determine the association between these three SNP's, in the vit D pathway and the genetic susceptibility to T1D in the Portuguese population.

We conducted a case-control study to analyse the prevalence of these SNP's in 320 T1D patients and 486 healthy controls, using PCR and restriction fragments length polymorphism techniques for the genotyping of the individuals. Allele and genotype frequencies were compared between patients and controls. We also analysed the association of these polymorphisms with several clinical parameters of the disease.

The results suggest that the *CYP2R1*-rs2060793 polymorphism is associated with an increased risk of T1D. We also observed a possible relation between this SNP and the development of diabetic retinopathy. A possible association between the *DHCR7*-rs12785878 polymorphism and the age of diagnosis was observed, as the heterozygote genotype seems to be associated with the development of anti-GAD65 antibodies. We detected a trend of association between the *DHCR7*-rs12785878 and *CYP24A1*-rs6013897 SNP's and the gender of the patient. Our findings need to be confirmed and reassessed in new studies with larger populations, however, they may contribute to a better understanding of the pathogenesis of T1D and of the role of vit D in autoimmunity and in the genetic susceptibility to T1D.

## Keywords

Type 1 Diabetes; Vitamin D; Genetics; Polymorphisms; Endocrinology

# Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
1. Introdução .....	1
1.1. Diabetes mellitus tipo 1 .....	1
1.1.1. Definição e epidemiologia .....	1
1.1.2. Etiopatogenia .....	2
1.1.3. Factores de risco da diabetes mellitus tipo 1 .....	5
1.2. Vitamina D .....	8
1.2.1. Metabolismo e mecanismo de acção da vitamina D .....	8
1.2.2. Factores que influenciam os níveis de vitamina D.....	10
1.2.3. Importância da vitamina D na saúde.....	11
1.2.4. O papel da vitamina D na diabetes mellitus tipo 1 .....	12
1.2.5. Estudos genéticos de associação entre a vitamina D e a diabetes mellitus tipo 1	16
1.3. Objectivo do estudo.....	17
2. Materiais e métodos .....	18
2.1. População de estudo .....	18
2.2. Extracção e purificação de DNA a partir de sangue periférico .....	18
2.3. Reacção de polimerização em cadeia (PCR) .....	20
2.4. Digestão enzimática.....	21
2.5. Electroforese em gel de agarose.....	22
2.6. Sequenciação de DNA .....	23
2.7. Análise estatística .....	25
3. Resultados.....	26
3.1. Polimorfismo DHCR7 .....	26
3.2. Polimorfismo CYP2R1 .....	27
3.3. Polimorfismo CYP24A1 .....	27

3.4.	Análise estatística .....	28
3.4.1.	Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) .....	28
3.4.2.	Análise dos polimorfismos.....	29
3.4.3.	Análise da idade de diagnóstico .....	30
3.4.4.	Análise de género .....	30
3.4.5.	Análise do autoanticorpo anti-GAD65.....	31
3.4.6.	Análise do valor de peptídeo-C .....	32
3.4.7.	Análise de coexistência de outras doenças autoimunes .....	32
3.4.8.	Análise de nefropatia Diabética .....	33
3.4.9.	Análise de retinopatia diabética.....	34
4.	Discussão e Conclusão .....	35
5.	Bibliografia.....	41

# Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b> Patogénese da diabetes mellitus tipo 1 .....	4
<b>Figura 2-</b> Fotoprodução e metabolismo da vitamina D .....	9
<b>Figura 3-</b> Órgãos alvo e mecanismo de acção do calcitriol .....	10
<b>Figura 4-</b> Efeitos biológicos da vit D sobre o sistema imunitário .....	12
<b>Figura 5-</b> Genotipagem do polimorfismo DHCR7-rs12785878 (T>G) .....	26
<b>Figura 6-</b> Genotipagem do polimorfismo CYP2R1- rs2060793 (G>A).....	27
<b>Figura 7-</b> Genotipagem do polimorfismo CYP24A1- rs6013897 (T>A) .....	28

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Primers e condições de optimização da reacção de PCR para cada polimorfismo ..	21
<b>Tabela 2-</b> Polimorfismos em estudo, genótipos esperados e peso molecular dos respectivos fragmentos gerados por restrição enzimática .....	22
<b>Tabela 3-</b> Análise das frequências genotípicas e alélicas dos doentes e controlos .....	29
<b>Tabela 4-</b> Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante a idade de diagnóstico ..	30
<b>Tabela 5-</b> Análise das frequências genotípicas e alélicas dos doentes consoante o género....	31
<b>Tabela 6-</b> Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante a presença ou ausência do anticorpo anti-GAD65 .....	31
<b>Tabela 7-</b> Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante o valor de peptídeo-C ...	32
<b>Tabela 8-</b> Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante a presença ou ausência de outras doenças autoimunes .....	33
<b>Tabela 9-</b> Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante a presença ou ausência de nefropatia diabética.....	33
<b>Tabela 10-</b> Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante a presença ou ausência de retinopatia diabética.....	34

# Lista de abreviaturas

**°C:** Graus centígrados

**7-DHC:** 7-dihidrocolesterol

**µg:** Micrograma

**µL:** Microlitro

**µM:** Micromolar

**A:** Absorvância

**ADA:** American Diabetes Association (associação americana de Diabetes)

**AIC:** Akaike Information Criterion (critério de informação de Akaike)

**APC's:** Antigen Presentation Cells (células apresentadoras de antigénio)

**CHBV:** Centro Hospitalar do Baixo Vouga

**CHUC:** Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

**DBP:** Vitamin D Binding Protein (proteína de ligação da vitamina D)

**DC's:** Dendritic Cells (células dendríticas)

**ddNTP:** Dideoxynucleotides Triphosphates (didesoxinucleótidos trifosfatados)

**DM:** Diabetes Mellitus

**DM1:** Diabetes Mellitus Tipo 1

**DM2:** Diabetes Mellitus Tipo 2

**DNA:** Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)

**dNTPs:** Deoxyribonucleotides Triphosphates (desoxirribonucleótidos trifosfatados)

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etileno-diamino-tetra-acético)

**EUA:** Estados Unidos da América

**GABA:** Gamma-aminobutyric acid (ácido gama aminobutírico)

**GAD65:** Glutamic Acid Descarboxylase 65 (descarboxilase do ácido glutâmico 65)

**GWAS:** Genome Wide Association Study (estudo de associação genética)

**HbA1c:** Hemoglobina glicada

**HLA:** Human Leukocyte Antigen (sistema antigénio leucocitário humano)

**HWE:** Hardy-Weinberg Equilibrium (equilíbrio de Hardy-Weinberg)

**IA-2A:** Insulinoma-2-Associated Autoantibodies (anticorpos anti proteína tirosina fosfatase 2)

**IAA:** Insulin Auto Antibodies (anticorpos anti insulina)

**IC:** Intervalo de Confiança

**ICA:** Islet Cell cytoplasmic Antibodies (anticorpos anti células ilhéus pancreáticos)

**IFN:** Interferon (interferão)

**IL:** interleucine (interleucina)

**kg:** Kilo gramas

**kV:** Kilo Volts

**LADA:** Latent Autoimmune Diabetes of Adults (diabetes autoimune latente dos adultos)

**M:** Molar

**m/v:** Massa por Volume

**MHC II:** Major Histocompatibility Complex II (complexo de histocompatibilidade classe II)

**mg:** Miligrama

**mL:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**mV:** Milivolt

**ng:** Nanograma

**nm:** Nanómetros

**NOD:** Non Obese Diabetic mice (rato diabético não obeso)

**OR:** Odds Ratio (Razão de probabilidade)

**pb:** Pares de base

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (reação de polimerização em cadeia)

**PTH:** Parathyroid Hormone (hormona da paratiróide)

**RBC:** Red Blood Cell

**RNA:** Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)

**rpm:** Rotações Por Minuto

**RXR:** Retinoic X Receptor alfa (receptor X retinóico alfa)

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate (dodecil sulfato de sódio)

**SE:** Secondary Extraction (extração secundária)

**SLO:** síndrome Smith-Lemli-Opitz

**SLS:** Sample Loading Solution (solução de carregamento de amostras)

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo único)

**TAE:** Tris-Acetate-EDTA

**Taq:** Thermus aquaticus

**T CD8+:** Linfócitos T CD8+

**T CD4+:** Linfócitos TCD4+

**TE:** Tris-EDTA

**Th1:** Linfócitos T tipo Th1

**Th2:** Linfócitos T tipo Th2

**Th17:** Linfócitos T tipo Th17

**TNF:** Tumor Necrose Factor (Factor de necrose tumoral)

**Treg:** Linfócitos T reguladores

**Tris:** Tris-hidroxi-metil-amino-metano

**U:** Unidades

**UI:** Unidades internacionais

**UV:** Ultra Violeta

**UVB:** Ultra Violeta B

**VDR:** Vitamin D Receptor (Receptor da vitamina D)

**VDRE:** Vitamin D Responsive Element (Elemento de DNA responsivo à Vit D)

**Vit D:** Vitamina D

**ZnT8:** Transportador de zinco T8

# 1. Introdução

## 1.1. Diabetes mellitus tipo 1

### 1.1.1. Definição e epidemiologia

A diabetes mellitus (DM), é uma doença metabólica que se caracteriza pela presença crónica do estado de hiperglicemia, provocando distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas. A hiperglicemia caracteriza-se pela presença de glicose em excesso na circulação sanguínea, como resultado de defeitos na secreção e/ou acção da insulina, a hormona responsável por induzir a captação de glicose do sangue para as células de modo a produzir energia <sup>1</sup>. Existem duas formas principais de apresentação da DM, a diabetes tipo 1 (DM1), resultante do processo autoimune contra as células B pancreáticas e a diabetes tipo 2 (DM2), a forma mais comum que resulta de defeitos na secreção e/ou acção da insulina culminando num estado de resistência à acção da insulina <sup>1</sup>.

Estamos neste momento a assistir a um novo paradigma no que diz respeito à forma como identificamos e interpretamos a disfunção da célula B <sup>2</sup>. A hiperglicemia, como consequência da destruição e/ou da disfunção da célula B, é o factor comum a todos os tipos de DM. Com base neste facto, surge a proposta de centrar a classificação da DM1 na disfunção específica que ocorre nas células B, permitindo a escolha da terapia mais adequada consoante a via mediadora do estado de hiperglicemia. A Associação Americana de Diabetes (ADA) realça ainda a importância de esclarecer as alterações imunológicas que ocorrem no microambiente das células B, de modo a adequar a terapia que deve ter como objectivo final, a manutenção da actividade das células B <sup>2</sup>.

As atenções têm estado centradas no preocupante aumento da incidência da DM2 nos jovens. No entanto, a partir da década de 60 a taxa de incidência da DM1 tem vindo a aumentar a um ritmo dramático de cerca de 3-5% por ano mundialmente. A taxa de incidência da DM1 é variável entre as populações, a China e a Venezuela são os países com as menores taxas de incidência (0,1/100000), enquanto a Finlândia (40,9/100000) apresenta a maior taxa de incidência de DM1 <sup>3</sup>. Nos países Europeus, apesar de as populações serem geneticamente semelhantes, existem grandes variações na incidência da DM1, observando-se um gradiente na taxa de incidência, de Norte para Sul do continente <sup>4</sup>. Os países escandinavos (Finlândia, Suécia, Noruega e Dinamarca) juntamente com a Escócia apresentam as maiores taxas de incidência, seguidos do Reino Unido. Os países da Europa Central e Leste têm taxas de incidência intermédias e os países do Sul da Europa apresentam as menores taxas de incidência <sup>4-6</sup>. Em 2014 estimava-se que a maioria dos novos casos de DM1 seriam crianças europeias <sup>7</sup>. A análise da evolução da taxa de incidência da DM1 revelou um maior aumento da incidência em crianças entre 0-4 e 5-9 anos, sugerindo que ao longo do tempo a DM1 tem

vindo a manifestar-se cada vez mais cedo <sup>5,7</sup>. De realçar que o mais rápido aumento da DM1 é observado nos países da Europa Central e de Leste, onde ocorrem as maiores alterações do estilo de vida, marcadas pelo crescimento socioeconómico e industrial <sup>6</sup>. O estilo de vida dos europeus é cada vez mais uniforme, o que poderá explicar a convergência do valor da taxa de incidência da DM1 entre os países <sup>3,8</sup>. A taxa de incidência da DM1 tem aumentado 3,9% por ano na Europa, as previsões estimam a identificação de 24400 novos casos em 2020 e a duplicação dos casos em crianças com menos de 5 anos.

O relatório “Factos e números”, do observatório nacional da diabetes, apresenta números respeitantes ao ano de 2015 em Portugal. Dos 7,7 milhões de portugueses entre os 20 e os 79 anos, 13,3% são diabéticos, no entanto, esta prevalência não diferencia a DM1 de outros tipos de DM. A nível nacional, a DM1 afecta 0,16% (3327 pessoas) da população entre os 0 e os 19 anos, com a identificação de 13,3/100000 novos casos (0-14 anos). Estes números têm-se mantido estáveis ao longo dos últimos anos na população portuguesa <sup>9</sup>.

A DM é um dos principais problemas de saúde pública mundial, com elevado impacto orçamental na economia dos países, sendo de extrema importância actuar ao nível da prevenção de modo a inverter as tendências registadas. Para uma prevenção eficaz da DM são necessários esclarecimentos sobre a sua patogénese, identificando novos biomarcadores e novas terapias moleculares centradas na disfunção da célula B.

### **1.1.2. Etiopatogenia**

A DM1 afecta 5-10% do total de diabéticos a nível mundial. Esta doença caracteriza-se pela destruição das células produtoras de insulina, as células B pancreáticas, por parte de linfócitos T autoreactivos e citocinas pró-inflamatórias, duas características do processo autoimune. O ataque imunitário às células B induz a apoptose destas células, que perdem a capacidade de produção de insulina, tornando impossível a captação de glicose da corrente sanguínea para o interior das células. Por isso os doentes necessitam de administrações diárias de insulina para o seu controlo glicémico e sobrevivência <sup>10</sup>.

Através do recrutamento de pessoas geneticamente susceptíveis para a DM1, foram realizados estudos sobre a progressão da doença que concluem que a DM1 se inicia muito antes do aparecimento dos sintomas clínicos associados <sup>11</sup>. Foram definidas três fases principais da DM1, com o objectivo de melhorar e facilitar o diagnóstico precoce da doença, criando a possibilidade de intervir antes da morte da maioria das células B <sup>12</sup>: Fase 1- O indivíduo apresenta dois ou mais autoanticorpos associados à DM1, os biomarcadores indicativos do processo autoimune pancreático. Nesta fase o indivíduo apresenta valores de normoglicémia sem quaisquer sintomas. Fase 2- O indivíduo apresenta dois ou mais autoanticorpos pancreáticos positivos em associação com a intolerância à glicose (disglicémia) provocada pela perda de funções das células B. O indivíduo apresenta valores alterados de glicose em jejum ( $\geq 125$  mg/dL), do teste de tolerância oral à glicose ( $\geq 140$  mg/dL) e dos níveis de HbA1c

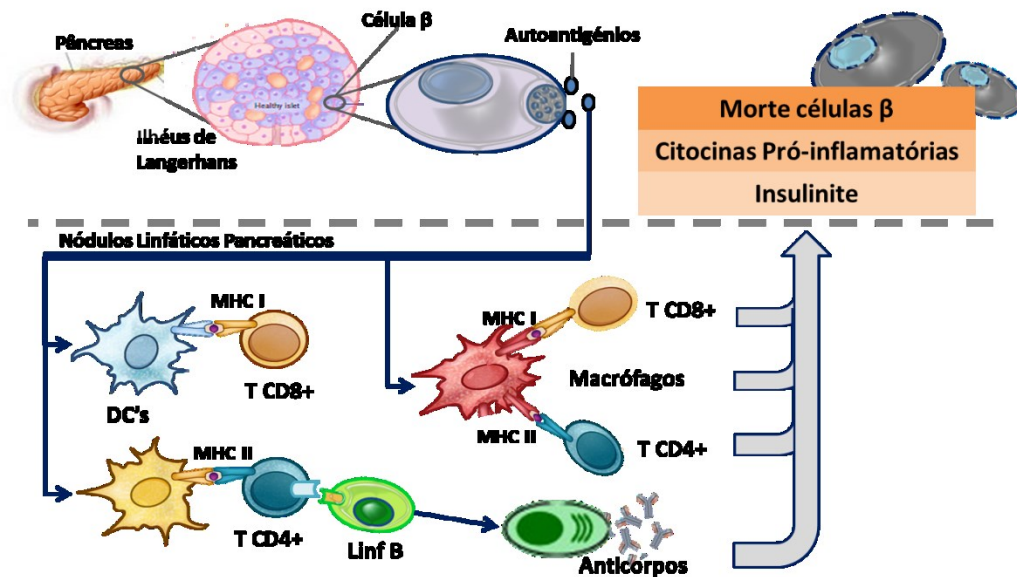
(≥5,7%). A alteração destes parâmetros é indicativa da progressão da doença. Fase 3- O indivíduo manifesta os sintomas clínicos típicos da doença que incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, fadiga, cetoacidose diabética, entre outros. Esta é chamada de fase crónica e sintomática da DM1, marcada pelo declínio da secreção de peptídeo-C, como resultado da produção inexistente ou residual de insulina, sendo necessária a administração de insulina para a sobrevivência do doente.

A clarificação das fases de progressão da doença veio melhorar a identificação dos doentes adultos que podem apresentar uma destruição lenta das células  $\beta$ , mantendo a capacidade de produção endógena de insulina por mais tempo do que as crianças e jovens, caracteristicamente afectados pela DM1. Esta sub-forma da DM1 denomina-se por LADA (diabetes autoimune latente dos adultos)<sup>13</sup> e a identificação destes casos veio realçar a atenção necessária na altura do diagnóstico e na prescrição de terapias.

Uma vez iniciada a insulino-terapia, o doente pode experienciar uma fase de remissão transitória da doença denominada por “Lua de Mel”, onde ocorre a recuperação parcial das funções da célula  $\beta$  com manutenção dos níveis de peptídeo-C. Caracteristicamente, nesta fase há uma diminuição da dose de insulina exógena necessária e o controlo glicémico está normalizado. Clinicamente, este é um período com potencial para intervenção terapêutica no sentido de tentar parar o processo de destruição das células  $\beta$ . A longo prazo, a existência deste período está associada à diminuição da dose de insulina necessária, ao melhor controlo metabólico e ao aparecimento tardio das complicações associadas (retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética) à DM1, mesmo após o termino da fase de remissão <sup>14,15</sup>.

Cada pessoa tem um determinado grau de susceptibilidade para desenvolver DM1, mas é da interacção entre os factores genéticos individuais e os factores ambientais que, em algum momento, se inicia uma resposta inflamatória pancreática. Como resposta a um agente ainda desconhecido, inicia-se a migração e infiltração de macrófagos e linfócitos T CD8+ no pâncreas, dando início à condição denominada por insulinite <sup>16</sup>. A insulinite corresponde à fase assintomática da DM1 e pode persistir durante meses ou décadas. Pensa-se que seja através da morte fisiológica das células  $\beta$ , em momentos de renovação de tecido, que ocorre a libertação dos primeiros autoantígenos pancreáticos, nos ilhéus pancreáticos. As células T potencialmente diabetogénicas circulam nos nódulos linfáticos pancreáticos onde lhes é apresentado o autoantígeno, pelas células apresentadoras de antígenos (APC's). Após a apresentação do autoantígeno, as células T adquirem capacidade migratória e atacam o pâncreas onde se tornam autorreactivas contra as células  $\beta$  (figura 1). A apresentação dos autoantígenos às células T CD4+, promove a diferenciação destas células em células do tipo Th1 com características pró-inflamatórias e células do tipo Th2 caracteristicamente anti-inflamatórias <sup>17</sup>. As citocinas presentes em maior quantidade, secretadas pelas células Th1, como interferões do tipo 1 (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) activam vias de sinalização de morte celular, implicadas na morte das células  $\beta$  (granzimas e perforinas) e na amplificação do ataque autoimune (células TCD8+ e macrófagos). Na sequência da resposta autoimune desencadeia-se uma resposta humoral por parte de linfócitos B que se diferenciam em plasmócitos e

secretam anticorpos específicos contra proteínas das células B. A destruição progressiva das células B torna constante a libertação de novos autoantígenos, desencadeando a activação de novas células T e a formação de um novo tipo de autoanticorpo específico.



**Figura 1- Patogénese da diabetes mellitus tipo 1.** No pâncreas, as células B estão organizadas em aglomerados denominados, ilhéus de Langerhans. Os autoantígenos libertados pelas células B são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas-DC's e macrófagos), às células T CD4+ e T CD8+, nos nódulos linfáticos pancreáticos. Após a apresentação do autoantígeno as células T são activadas e infiltram o pâncreas, dando início à insulinite. Uma vez no pâncreas, estas células libertam citocinas pró inflamatórias, promovendo a morte das células B. As células T CD4+, por sua vez, apresentam o autoantígeno aos linfócitos B, que se diferenciam em plasmócitos, células produtoras de autoanticorpos anti célula B.

A descoberta dos anticorpos específicos dos ilhéus pancreáticos (ICA), em 1974, tornou clara a etiologia autoimune da DM1<sup>18</sup>. Estão identificados 4 autoanticorpos específicos para proteínas das células B, os anticorpos anti-Insulina (IAA), os anticorpos anti-GAD65 contra a enzima descarboxilase GAD-65, responsável pela formação do neurotransmissor GABA através de glutamina, os anticorpos IA-2A contra uma proteína do tipo tirosina fosfatase e por último os anticorpos anti transportador de zinco ZnT8<sup>19</sup>. Estes anticorpos são os melhores biomarcadores da autoimunidade da célula B e da progressão da DM1 dado que, 94% dos doentes manifestam pelo menos um destes anticorpos na altura do diagnóstico<sup>20</sup> e quanto mais tipos de anticorpos estiverem presentes maior é o risco de progressão da DM1<sup>21</sup>. Frequentemente, os primeiros anticorpos a aparecer são os IAA ou os anti-GAD65, enquanto o anticorpo IA-2A raramente é o primeiro a manifestar-se mas se for, prevê-se que a progressão da doença seja mais rápida<sup>22</sup>. O aparecimento precoce dos anticorpos aumenta o risco de progressão da doença, acelerando o processo<sup>21</sup>. Ao contrário do que se possa pensar, os anticorpos não são directamente patogénicos e não têm efeitos citotóxicos sobre a célula B, no entanto, a produção destes anticorpos pelos linfócitos B facilita a apresentação dos autoantígenos às células T CD8+, promovendo a DM1<sup>23</sup>.

### 1.1.3. Factores de risco da diabetes mellitus tipo 1

A DM1 é uma doença multifactorial em que factores genéticos e ambientais contribuem para o aparecimento e desenvolvimento da doença. Apesar dos muitos estudos existentes sobre a etiologia da DM1, devido à sua complexidade, ainda não foi possível estabelecer o agente responsável por despoletar a destruição das células  $\beta$  nem qual o mecanismo que dá início ao processo de destruição destas células.

A DM1 é uma patologia geneticamente complexa uma vez que vários *loci* genéticos contribuem para a susceptibilidade de desenvolver a doença. Estudos genéticos de famílias com historial de DM1 mostram que a susceptibilidade genética entre membros da mesma família depende do grau de parentesco entre o familiar e o doente, a taxa de concordância de incidência entre gémeos monozigóticos <sup>24</sup> é superior à existente entre gémeos dizigóticos, assim como o risco entre familiares de primeiro grau é superior ao de familiares em segundo grau <sup>25,26</sup>.

Nos anos 70, a região *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*) localizada no cromossoma 6p21 foi identificada como *locus* crítico para a susceptibilidade de várias doenças autoimunes, entre elas a DM1. O desenvolvimento das técnicas de análise genética permitiram estabelecer consistentemente esta associação <sup>27</sup>. O sistema *HLA* contém mais de 200 genes que compõem uma zona genómica altamente polimórfica, onde cerca de 40% dos genes estão relacionados com o sistema imunitário. Os genes *HLA* estão divididos em 3 classes (I, II e III), sendo os genes *HLA* classe II os que demonstram maior associação com a DM1. Por sua vez, os genes *HLA* II dividem-se em duas subclasses principais: *HLA-DR* e *HLA-DQ*. Cada subclasse codifica uma proteína que é amplamente expressa pelas APC'S, responsáveis pelo correcto reconhecimento e apresentação de antígenos às células T CD4+. Logo, variantes polimórficas que afectem a estrutura e/ou expressão destas proteínas podem alterar o reconhecimento dos autoantígenos, modelando a susceptibilidade para DM1. Os *loci* *HLA-DR* e *HLA-DQ* apresentam forte desequilíbrio de ligação <sup>25</sup>, isto é, dois alelos específicos de dois *loci* diferentes que tendem a ser encontrados juntos mais vezes do que o esperado, sendo herdados como se fossem um só gene, facto que torna difícil o estudo isolado de cada variante genómica. Por isso os estudos concentram-se na identificação de determinadas combinações ou haplótipos DR-DQ de modo a estratificar desde combinações de alto risco a combinações protectoras e posteriormente relacioná-las com a progressão da doença <sup>28</sup>.

Os haplótipos mais frequentes entre os doentes diabéticos são DR3-DQ2 e DR4-DQ8, e estão presentes em 90% dos DM1 e apenas em 40% da população geral <sup>29</sup>. O haplótipo heterozigótico DR3/DR4-DQ2/DQ8, é o haplótipo de maior risco (55%) para DM1 e está presente em cerca de 30% dos doentes <sup>10</sup>. O genótipo DR3/DR4 tornou-se um biomarcador de pessoas geneticamente susceptíveis para a DM1, identificando 20-40% dos casos. A análise destes haplótipos permitiu identificar o autoanticorpo anti-GAD65 como o primeiro a manifestar-se em pessoas homozigóticas HLA-DR3-DQ2, enquanto as pessoas homozigóticas HLA-DR4-DQ8 desenvolvem primeiro o autoanticorpo IAA <sup>26</sup>. Já os portadores do genótipo de alto risco HLA-DR3/DR4 têm

uma maior prevalência de anticorpos IAA e tendencialmente apresentam mais do que dois anticorpos <sup>30</sup>.

Estima-se que a variabilidade nos genes *HLA* classe II seja responsável por 50% da susceptibilidade genética para a DM1, sugerindo a existência de outros genes envolvidos na susceptibilidade genética da DM1. Os estudos de associação genética (GWAS) identificaram mais de 50 genes <sup>31</sup>, além dos *HLA*, com potencial papel na susceptibilidade para a DM1. Os genes que demonstram associações mais fortes com a DM1 são o gene da insulina humana; o gene *PTPN22* responsável pela inibição da activação de células T efectoras; o gene *CTLA-4*, importante para o bom funcionamento das células T reguladoras (Treg); o gene *IL2RA*, que actua na supressão da proliferação das células T e mais recentemente o gene *IFIH1*, que funciona como sensor de infecções virais <sup>10</sup>. As contribuições individuais destes genes para a susceptibilidade genética são aparentemente pequenas, no entanto, a sua identificação é importante para melhorar o entendimento da patogénese da doença, descobrir novos biomarcadores e novos alvos terapêuticos. De notar que muitos dos genes candidatos identificados estão envolvidos em processos imunológicos e demonstram associação com a DM1 mas também com outras doenças autoimunes, sugerindo a existência de mecanismos comuns.

Como referido, a incidência da DM1 tem vindo a aumentar a um ritmo acelerado, facto que não pode ser explicado apenas á luz dos factores genéticos por ocorrer num curto espaço de tempo. O papel preponderante dos factores ambientais, no aparecimento da DM1 é suportado pelo facto de: i) a taxa de concordância da doença entre gémeos ser apenas 50% <sup>24</sup>; ii) estudos migratórios mostram aumentos na incidência da DM1 em grupos que se deslocam de áreas de baixa incidência para áreas com elevada incidência <sup>32,33</sup>; iii) o aumento da incidência da DM1 tem sido acompanhado pela diminuição da frequência de genótipos de risco do sistema *HLA* <sup>34</sup> e apenas uma fracção das pessoas geneticamente susceptíveis desenvolvem a doença; iv) o maior aumento da incidência é observado em países com taxas de incidência moderadas e com rápido crescimento económico e industrial que promovem alterações do estilo de vida das populações e alterações ambientais <sup>5</sup>.

Da conjugação destas observações concluímos que a destruição das células B é um processo que se inicia após uma pessoa geneticamente susceptível para a DM1, ser exposta a um determinado factor de risco ambiental. A denominada “hipótese do gatilho”, explica isso mesmo, sugerindo a existência de factores ambientais capazes de despoletar o início do processo autoimune, de conduzir à autoimunidade e apoptose das células B ou de acelerar a progressão da doença <sup>35</sup>. São muitos os estudos realizados com o objectivo de entender a contribuição e os mecanismos pelos quais os factores ambientais desencadeiam a patogénese da DM1. Nesse sentido surgem hipóteses explicativas como a “hipótese da higiene” ou a “hipótese viral”.

A “hipótese da higiene” sugere que o desenvolvimento do sistema imunitário requer a sua estimulação na infância, através da exposição a diversos factores ambientais <sup>36</sup>. Isto porque, o

aumento da incidência da DM1 contrasta com a diminuição gradual de doenças infecciosas como a tuberculose ou infecções por *enterovírus*<sup>37</sup>, sugerindo que o aumento da DM1 pode ser consequência da menor exposição a agentes patogénicos devido à melhoria das condições sanitárias, da qualidade de vida, à vacinação e ao uso de antibióticos. No entanto, é de notar que os maiores aumentos na incidência da DM1 foram observados em países com uma industrialização acelerada. Este aumento pode ser explicado pelo crescimento da poluição atmosférica (ex. poluentes orgânicos persistentes e dioxinas), uma vez que, existem poluentes capazes de influenciar a função das células B e o aparecimento da DM1<sup>38,39</sup>. A melhoria da qualidade de vida das populações conduziu a alterações no estilo de vida, como o aumento da ingestão de alimentos e a diminuição da prática do exercício físico, as principais causas da obesidade. A resistência à acção da insulina é uma característica da obesidade e estimula o trabalho excessivo das células B, gerando um ambiente de stress celular que leva ao esgotamento das células pancreáticas, acelerando a sua apoptose<sup>40</sup> e possivelmente a progressão para a DM1. O aumento da obesidade infantil pode explicar o facto de a DM1 se manifestar cada vez mais cedo na infância.

Por outro lado, a “hipótese viral” defende que determinados vírus são capazes de iniciar ou acelerar o processo autoimune da DM1. Na teoria, os vírus podem desencadear este processo de duas maneiras, infectando directamente a célula B provocando a sua apoptose<sup>41</sup>, ou iniciando processos de autoimunidade como consequência do mimetismo molecular que leva o sistema imunitário próprio a confundir moléculas de origem viral com moléculas próprias, reagindo contra estas últimas. O *enterovírus* é o vírus mais fortemente associado à DM1. Estudos epidemiológicos identificaram um aumento da incidência da DM1 após epidemias por *enterovírus*<sup>41</sup> e foi detectado RNA (ácido ribonucleico) de *enterovírus* em doentes diabéticos recentemente diagnosticados<sup>42</sup>. Hoje é reconhecido o papel de alguns vírus na patogénese da DM1, no entanto o risco de desenvolver DM1 no decorrer de uma infecção viral deve ser interpretado tendo em conta o contexto genético da pessoa, pois a presença de determinadas variantes genéticas podem tornar a pessoa hipersensível a infecções das células B, desencadeando respostas antivirais exacerbadas que culminam na apoptose dessas células<sup>41</sup>.

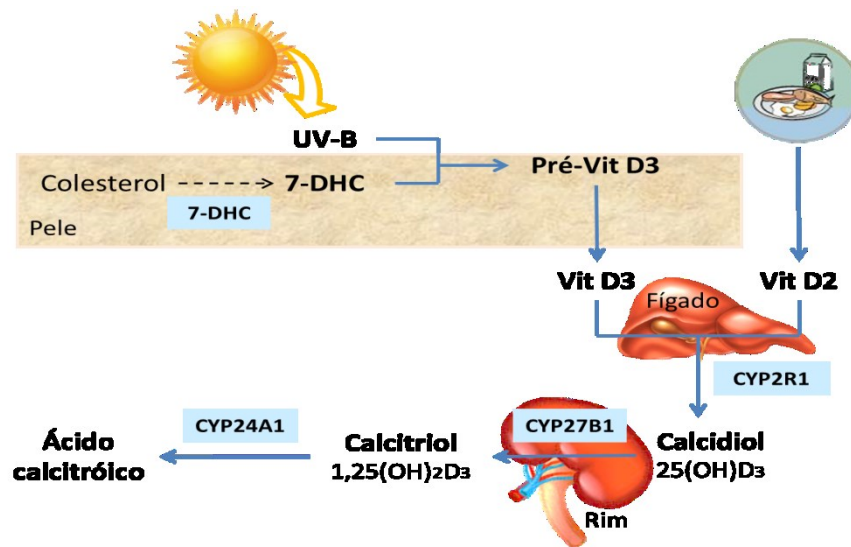
As teorias referidas têm como ênfase a necessidade de “treino” do sistema imunitário com o objectivo de criar mecanismos de defesa contra doenças autoimunes, nomeadamente a DM1. Como é de conhecimento geral, o leite materno é o responsável por fornecer esses mecanismos de defesa ao recém-nascido, devido ao seu elevado teor de anticorpos e células imunitárias que lhe conferem propriedades anti-microbianas e anti-inflamatórias. De facto, estudos demonstram a existência de uma relação inversa entre a alimentação com leite materno e o risco de DM1<sup>43,44</sup>. Por outro lado, a introdução precoce do leite de vaca na alimentação parece aumentar o risco de autoimunidade<sup>45</sup>. Isto porque, o leite de vaca pode induzir a inflamação da mucosa intestinal através do aumento da permeabilidade intestinal a antigénios da dieta, estimulando a secreção de citocinas inflamatórias e a resposta autoimune por parte de células T CD8+<sup>46,47</sup>. Ao fazer a análise dos estudos sobre esta matéria é necessário referir o papel do microbioma intestinal que pode ser afectado pela forma de

nascimento, dieta, infecções e pelo uso de antibióticos. Alterações nestes factores podem favorecer a disbiose intestinal favorecendo respostas aberrantes do sistema imunitário que podem conduzir à autoimunidade e DM1 em pessoas susceptíveis <sup>48</sup>. Entre os factores da dieta com associação com a DM1, além do leite materno e do leite de vaca, estudos demonstram associação entre os níveis de vitamina D (vit D) e a incidência da DM1. A importância da vitamina D como factor ambiental condicionante quer no aparecimento quer no desenvolvimento da DM1 será abordado ao longo das próximas secções.

## **1.2. Vitamina D**

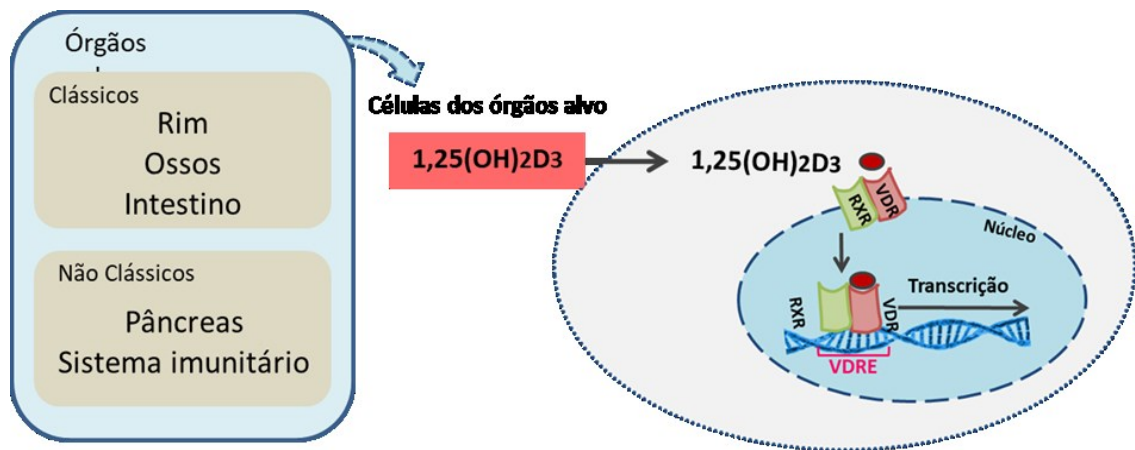
### **1.2.1. Metabolismo e mecanismo de acção da vitamina D**

A vitamina D<sub>3</sub> (vit D) pode ser obtida através da dieta uma vez que está presente em alguns alimentos de origem vegetal sob a forma de vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) como acontece nos cogumelos e está também presente sob a forma de vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) em alimentos de origem animal como bacalhau, atum ou óleo de fígado de bacalhau. No entanto, a quantidade de obtenção de vit D pela dieta é reduzida sendo o sol a principal fonte fornecedora de vit D. As radiações solares, nomeadamente as radiações UVB (290-310nm), entram em contacto com os queratinócitos presentes na pele desencadeando uma reacção fotoquímica entre a radiação UVB e o composto 7-dihidrocolesterol (7-DHC). Como resultado desta reacção fotoquímica, ocorre a formação da pré-Vit D<sub>3</sub> que sofre posteriormente uma isomerização espontânea, culminando na formação da Vit D<sub>3</sub> (figura 2) ainda numa forma biologicamente inactiva <sup>49,50</sup>. A vit D<sub>3</sub> é lipossolúvel, por isso, ao atingir a circulação sanguínea forma um complexo com a proteína transportadora de vitamina D (DBP). Numa primeira etapa, a DBP é responsável pelo transporte da vit D<sub>3</sub> até ao fígado, onde ocorre a primeira de duas hidroxilações. A hidroxilação hepática ocorre no carbono 25 (C-25) da vit D e é realizada pela enzima CYP2R1, com a formação do composto 25(OH)D<sub>3</sub>, o calcidiol. O calcidiol é o metabolito presente em maior quantidade na corrente sanguínea, funcionando como biomarcador de avaliação do estado nutricional de vit D. Este composto é posteriormente transportado pela DBP que o encaminha para diversos tecidos alvo, sendo o rim o mais conhecido.



**Figura 2- Fotoprodução e metabolismo da vitamina D.** A radiação UVB (290-315 nm) do sol entra em contacto com a pele, convertendo o composto 7-dihidrocolesterol (7-DHC) em pré-Vit D<sub>3</sub>, posteriormente convertida em vit D<sub>3</sub>. A vitamina D pode também ser obtida através da dieta sob a forma de vit D<sub>3</sub> (colecalfiferol) ou vit D<sub>2</sub> (ergocalciferol). As duas formas de vit D são transportadas até ao fígado pela proteína transportadora da vit D (DBP), onde pela acção da enzima CYP2R1 são convertidas em calcidiol (25(OH)D<sub>3</sub>). No rim e outros tecidos alvo a enzima CYP27B1 catalisa a conversão do calcidiol em calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), a forma biologicamente activa da vit D. Finalmente a enzima CYP24A1 é responsável pelo catabolismo principalmente do calcitriol, que é convertido em ácido calcitróico posteriormente excretado pela bÍlis.

No rim e outros tecidos, está presente a enzima CYP27B1 responsável pela hidroxilação do carbono 1 do calcidiol, transformando-o em calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). O calcitriol é a forma biologicamente activa da vit D, ou seja a forma responsável por desencadear as acções biológicas da vit D. Para tal, é necessário que o calcitriol chegue ao interior da célula onde será reconhecido pelo receptor da vitamina D (VDR). O VDR é um receptor nuclear presente em muitos tipos de células e quando reconhece o composto calcitriol, heterodimeriza com o receptor X retinóico alfa (RXR). O complexo formado dirige-se para o DNA (ácido desoxirribonucleico), onde vai ligar a elementos específicos do DNA responsivos à vit D, chamados VDRE's (figura 3). Estes elementos de DNA específicos estão presentes em zonas de regulação de genes alvo da vit D. Assim o efeito genómico da vit D traduz-se na activação ou inibição da transcrição de vários genes específicos, efeito alcançado após o recrutamento de moléculas co-reguladoras e de cofactores de transcrição para a zona dos VDRE's. Resumindo, a vit D tem a capacidade de regular a transcrição de cerca de 3% do genoma humano, compreendendo genes envolvidos em diversos processos biológicos regulados directa ou indirectamente pela vit D <sup>49</sup>. No final desta cascata de acções biológicas, a enzima CYP24A1 é responsável pelo catabolismo quer do calcidiol quer do calcitriol, convertendo-os em ácido calcitróico, um composto inactivo e solúvel em água que é posteriormente excretado pela bÍlis.



**Figura 3- Órgãos alvo e mecanismo de acção do calcitriol.** As células do rim, ossos e intestino, bem como as células pancreáticas e do sistema imunitário são células responsivas à acção da vit D. Nestas células, quando o calcitriol entra nas células é reconhecido pelo receptor nuclear da vitamina D (VDR). Após a ligação do calcitriol ao VDR, este heterodimeriza como o receptor X retinóico alfa (RXR) e moléculas co estimuladoras. O complexo formado liga a elementos específicos do DNA responsivos à vit D, os VDRE's, modelando a taxa de transcrição de cerca de 3% do genoma humano.

### 1.2.2. Factores que influenciam os níveis de vitamina D

A obtenção de vit D através da dieta é reduzida, quando comparada com a quantidade de vit D produzida por fotoprodução. Assim, factores que alterem a quantidade de radiações UVB incidentes na pele, afectam directamente a taxa biossintética de vit D. A disponibilidade de luz solar (radiação UVB) segue um padrão latitudinal, os países situados a latitudes mais próximas do Equador (latitude 0°) têm um maior número de horas de sol do que os países localizados a latitudes extremas<sup>51,52</sup>. Nestes países de latitudes extremas a principal fonte de vit D está comprometida, sendo recomendada a suplementação das populações com vit D como estratégia de prevenção do raquitismo/osteomalacia. A disponibilidade de luz solar varia consoante a estação do ano. A taxa de biossíntese da vit D é especialmente afectada durante o Outono/Inverno, devido à menor quantidade de sol e ao uso de roupas que protegem do frio<sup>53</sup>. Os níveis de vit D são também afectados pelo envelhecimento<sup>54</sup>, associado à diminuição do número de queratinócitos na pele, limitando a biossíntese de vit D. Além da idade, também a quantidade de melanina é inversamente proporcional a taxa de produção de vit D. O défice preponderante de vit D em populações que reúnem condições óptimas para a produção endógena de vit D, reflecte o mau aproveitamento da luz solar e prende-se com alterações no estilo de vida. Por exemplo, as crianças das sociedades desenvolvidas deixaram de brincar na rua e preferem os videojogos em casa. Acrescenta-se ainda o uso excessivo de protectores solares e cosméticos com protecção UVB que prejudicam a biossíntese de vit D.

Existem também factores genéticos que interferem com a via de metabolismo e com os níveis de vit D, afectando a saúde humana. Por exemplo, mutações raras no gene *DHCR7*, são responsáveis pelo síndrome de Smith-Lemli-Optiz (SLO)<sup>55</sup>, caracterizado por anomalias

congénitas e atraso mental. O raquitismo dependente de vit D tipo 1B <sup>56</sup>, é consequência de uma mutação no exão 2 do gene *CYP2R1*, que altera a sequência da enzima eliminando a sua actividade. Por último, mutações que alteram a actividade da enzima *CYP24A1*, podem conduzir à hipercalcémia idiopática infantil <sup>57</sup>, como resultado de defeitos na homeostase do ião cálcio.

Além destas condições raras, estudos reportam que parte da variabilidade dos níveis de vit D se deve a factores genéticos hereditários, ou seja, genótipos diferentes em determinados genes modificam os níveis de vit D. Wang et al. sugerem que cerca de 1-4% da variabilidade dos níveis de vit D é explicada pela presença de polimorfismos de nucleótido único (SNP's-single nucleotide polymorphisms) nos genes *DHCR7*, *GC* e *CYP2R1*, responsáveis respectivamente pela síntese, transporte e metabolismo da vit D <sup>58</sup>. Neste estudo, com indivíduos europeus e americanos, os polimorfismos *DHCR7*-rs12785878, *CYP2R1*-rs2060793 e *CYP2R1*-rs2282679 mostraram estar significativamente associados com os níveis de vit D. Além destes, o polimorfismo rs6013897 presente no gene da enzima *CYP24A1*, foi identificado como possível candidato a associação com os níveis de vit D <sup>58</sup>. Mais tarde, através da análise da população inglesa confirma-se que a presença dos SNP's *DHCR7*-rs12785878, *CYP2R1*-rs10741657 e rs12794714 influencia os níveis de vit D <sup>59</sup>. As descobertas feitas são corroboradas por outros investigadores <sup>60,61</sup>. Podemos então concluir que existem variantes nos genes das enzimas responsáveis pelo metabolismo da vit D, capazes de alterar a quantidade de vit D circulante, influenciando a saúde humana.

### 1.2.3. Importância da vitamina D na saúde

O sistema endócrino que compreende a acção conjunta da vit D e da hormona paratiroideia (PTH) é o principal responsável pela regulação da homeostase dos iões de cálcio e de fosfato, essenciais em múltiplos processos biológicos. Os principais locais de acção destas hormonas são o osso, o intestino e o rim. A vit D foi inicialmente descoberta como nutriente essencial para a prevenção do raquitismo/osteomalacia <sup>62</sup>. Em condições de hipocalcémia, a vit D induz a libertação de cálcio e fosfato a partir do osso, dando prioridade à manutenção dos níveis de cálcio em detrimento da integridade óssea <sup>63</sup>. De facto, a correcta suplementação com vit D reduz o risco de fracturas ósseas em 20%. Ao nível do intestino, a vit D é responsável por estimular e regular a absorção dos iões de cálcio e de potássio obtidos através da dieta <sup>63</sup>. O rim, especificamente o túbulo proximal, é o principal local de síntese da forma biologicamente activa da vit D (calcitriol) e é o local onde ocorre a reabsorção do ião fosfato, processo regulado indirectamente pela vit D. No túbulo distal, a vit D e a PTH são responsáveis pela reabsorção de cálcio <sup>63</sup>.

Houve uma mudança de perspectiva em relação ao papel biológico da vit D, quando foi descoberta a presença do VDR em vários tipos de células e tecidos, além dos referidos anteriormente. Muitos investigadores aprofundaram os conhecimentos sobre este novo tema e

hoje, com a identificação dos efeitos não clássicos da vit D, esta é reconhecida como uma hormona que regula a taxa de transcrição de muitos genes envolvidos, principalmente, no ciclo de vida celular e na resposta imunitária. A capacidade do calcitriol para regular o ciclo de vida celular sugere a existência de um papel da vit D ao nível da prevenção do cancro.

A identificação do VDR em praticamente todos os tipos de células do sistema imunitário <sup>64</sup> foi o ponto de partida para a descoberta dos efeitos imunomoduladores da vit D. As principais acções desencadeadas pela vit D ao nível do sistema imunitário são a estimulação da tolerância imunitária e a diminuição da resposta autoimune (figura 4). As investigações seguiram-se no sentido de estabelecer relações entre a vit D e as doenças autoimunes, resultantes do ataque imunitário a células próprias com deterioração da tolerância imunitária, como a DM1.

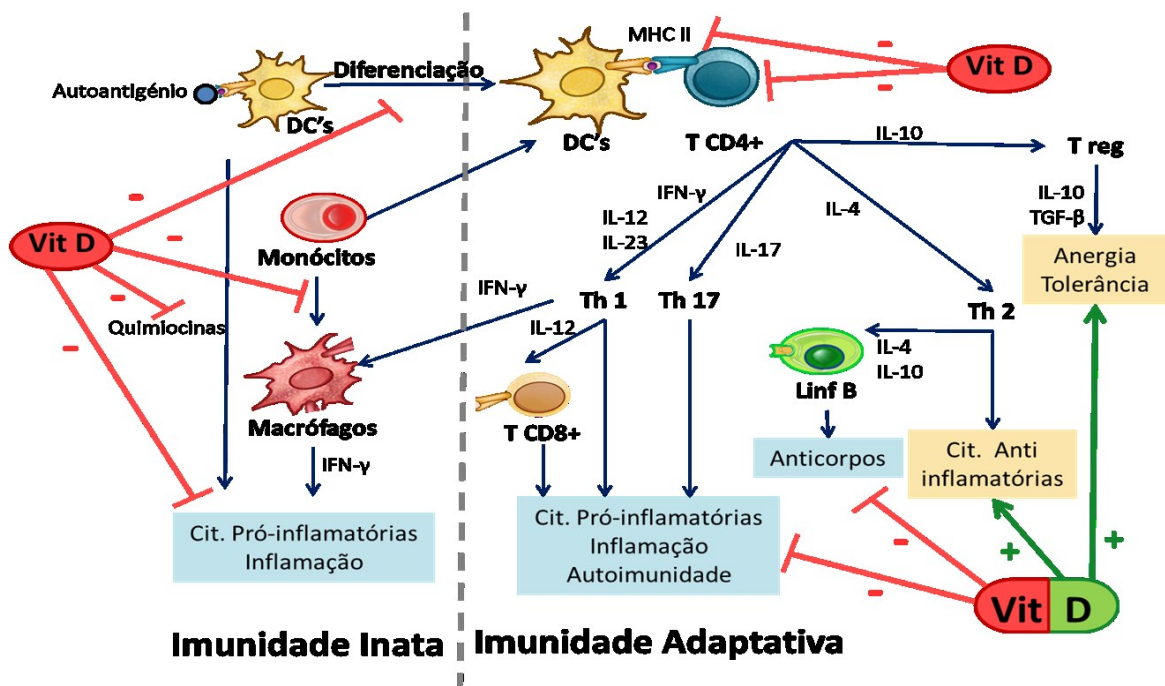


Figura 4- Efeitos biológicos da vit D sobre o sistema imunitário. Após a apresentação dos autoantígenos pelas DC's aos linfócitos T CD4+, estes diferenciam-se consoante o perfil de citocinas existente, estimulando ou não a inflamação e autoimunidade. A vit D desencadeia as suas acções a vários níveis, por um lado inibe a libertação de quimiocinas pelas células atacadas, inibe a formação de macrófagos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias por eles produzidas, inibe a diferenciação e proliferação das células DC's assim como diminui a eficácia da apresentação antigénica (inibe a expressão moléculas MHC II). A vit D inibe também a secreção de citocinas pró inflamatórias por parte dos linfócitos T do tipo Th1 e Th17 inibindo a formação de células T CD8+ responsáveis por exacerbar o processo autoimune e inibe a produção de anticorpos pelos linfócitos B, uma vez que impede a sua proliferação e diferenciação em plasmócitos. Por outro lado, a vit D é capaz de estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias provocando a alteração do perfil de citocinas presente, estimulando a formação de células do tipo Th2 e Treg, responsáveis pela manutenção da anergia e tolerância imunitárias, que foram afectadas durante o processo autoimune.

#### 1.2.4.O papel da vitamina D na diabetes mellitus tipo 1

As células B pancreáticas, organizadas em grupos denominados, ilhéus de Langerhans, têm como principal função a síntese e secreção de insulina. O processo de secreção de insulina

requer o influxo de cálcio para a célula  $\beta$ , processo regulado pela PTH e vit D. Posto isto, a secreção óptima de insulina depende da regulação dos níveis de cálcio pela vit D. A identificação do VDR e da enzima CYP27B1 nas células  $\beta$ , bem como de um VDRE no promotor do gene da insulina <sup>65</sup>, tornou clara a existência de um papel directo da vit D no funcionamento da célula  $\beta$ . A activação do VDR na célula  $\beta$  aumenta a transcrição do gene da insulina <sup>66</sup> e promove o aumento da expressão do receptor da insulina, melhorando a acção e sensibilidade à hormona <sup>67</sup>. A suplementação das células  $\beta$  com calcitriol, aumentou e acelerou a capacidade biossintética de insulina <sup>68</sup>. A vit D regula ainda a expressão da proteína calbindina, presente nas células  $\beta$  e responsável por estimular a libertação de insulina <sup>69</sup>.

A DM1 tem início após o reconhecimento de um autoantígeno, derivado das células  $\beta$ , por parte das células APC's (DC's e macrófagos). Já nos nódulos linfáticos as DC's apresentam o autoantígeno às células T imaturas, activando-as. A vit D inibe a proliferação e diferenciação das DC's e a expressão de moléculas MHC II à sua superfície <sup>70-72</sup>, comprometendo a apresentação dos autoantígenos (figura 4). A apoptose das células  $\beta$  leva à libertação de quimiocinas que, por sua vez, promovem o recrutamento de células imunitárias para o pâncreas, iniciando o processo inflamatório denominado por insulinite <sup>17</sup>. As células T CD8+ e os macrófagos são os primeiros a infiltrar o pâncreas <sup>73</sup>, e a atacar as células  $\beta$  através de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e de mecanismos de citólise celular (perforinas e granzimas) <sup>17</sup>. A vit D além de inibir a produção de quimiocinas pelas células  $\beta$ , inibe também a diferenciação dos monócitos em macrófagos e a activação das células T CD8+, retardando a insulinite <sup>17</sup>. Enquanto a infiltração do pâncreas ocorre, na periferia verifica-se a activação de novas células T CD4+ que se diferenciam consoante o perfil de citocinas presente. As citocinas predominantes são pró-inflamatórias (IL-12, IL-23 e IFN- $\gamma$ ) e secretadas pelas APC's, promovendo a diferenciação das células T CD4+ em células do tipo Th1 e Th17. Estas células também secretam citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e IFN- $\gamma$ ), melhorando a acção citotóxica dos linfócitos TCD8+ e citolítica dos macrófagos, sobre as células  $\beta$ . A vit D inibe a proliferação, activação e conseqüente diferenciação das células T CD4+. No entanto, estes efeitos são o resultado da regulação do estado de maturação das DC's, por um lado a vit D inibe a secreção de IL-12, citocina necessária para a activação das células T CD4+, por outro lado, estimula a libertação de IL-10 induzindo a formação de células Treg. O aumento do número de células Treg promove a alteração do perfil de citocinas inflamatório (tipo Th1) para um perfil anti-inflamatório (tipo Th2/Treg) promovendo os mecanismos de tolerância imunitária que estão afectados no contexto da DM1. A vit D actua ainda sobre os linfócitos  $\beta$ , responsáveis pela produção dos autoanticorpos específicos contra as células  $\beta$ , inibindo a sua proliferação e a produção de novos anticorpos. Concluindo, a vit D protege as células  $\beta$ , prolongando a sua sobrevivência, retardando a insulinite e a progressão da DM1, desmontando a capacidade de criar respostas autoimunes exacerbadas e paralelamente promovendo a tolerância e anergia imunitárias.

O modelo animal *non-obese-diabetic* (NOD) mice é o mais utilizado na investigação dos mecanismos da DM1 e na procura de agentes terapêuticos. O modelo NOD desenvolve DM1 espontaneamente, como resultado da destruição das células  $\beta$  mediada por células T autoreactivas, à semelhança do que ocorre nos humanos <sup>74</sup>. Ao comparar modelos NOD controlo e NOD com défice de vit D <sup>75</sup>, constatou-se que este último grupo apresentava taxas de incidência de DM1 superiores, com manifestação precoce da doença, sugerindo que o controlo dos níveis de vit D retarda o desenvolvimento da DM1 <sup>76</sup>. Da comparação dos níveis de vit D (calcidiol) entre doentes DM1 e a população saudável podemos concluir que o défice e/ou insuficiência de vit D é prevalente na população saudável, mas mesmo assim, os doentes DM1 têm níveis de vit D inferiores aos dessa população. Além disso, o aumento da incidência da DM1 coincide com o aumento paralelo do défice/insuficiência de vit D. Na Europa, a incidência da DM1 segue o mesmo padrão latitudinal observado para a disponibilidade de luz solar, sendo que países localizados a latitudes extremas apresentam taxas de incidência três vezes superiores às dos países próximos do Equador <sup>51,52</sup>. De facto, o aumento de apenas 1 grau de latitude aumenta em 3,5% o risco de desenvolver DM1 <sup>77</sup>. Nos países onde a principal fonte de vit D está comprometida, o fornecimento de vit D às populações é garantido através de comida fortificada. A introdução deste meio de suplementação na Dinamarca diminuiu o défice de vit D e diluiu o padrão sazonal do diagnóstico da DM1, pois os níveis de vit D deixaram de ser tão afectados pelo número de horas de sol consoante a estação do ano <sup>53</sup>. O diagnóstico de DM1 segue um padrão sazonal, sendo a maioria dos casos detectados durante o Inverno, enquanto que no Verão ocorre uma quebra no número de diagnósticos. Este padrão sazonal é sobretudo observado nos países situados a latitudes extremas <sup>78</sup>, evidenciando a importância da manutenção dos níveis de vit D nesses países. A relação inversa entre os níveis de vit D e a incidência da DM1 foi também detectada em países com elevada disponibilidade de sol <sup>79-87</sup>. Nos países árabes, a população saudável apresenta níveis baixos de vit D, tal é explicado pelo uso das roupas tradicionais e pelo estilo de vida domiciliário que limitam a exposição ao sol, afectando a biossíntese de vit D. Um estudo Israelita destaca isso mesmo reportando que é a população religiosa que apresenta menores níveis de vit D no país <sup>88</sup>.

Os investigadores procuraram estabelecer relações entre parâmetros clínicos da DM1 e os níveis de vit D. Um estudo Sueco verificou que o défice de vit D durante a gravidez aumenta a probabilidade de aparecimento dos autoanticorpos anti-GAD65 e IA-2A na descendência <sup>89</sup>. Foi também detectada a relação inversa entre os níveis de vit D e a severidade da manifestação da cetoacidose <sup>80,90</sup>. Soliman G.T. *et al.* afirmam que o défice de vit D é mais prevalente em crianças com mau controlo glicémico <sup>91</sup>. O défice de vit D está também associado ao aumento da dose diária de insulina e da percentagem de HbA1c <sup>92,93</sup>, mas o ajuste dos níveis de vit D melhorou estes parâmetros metabólicos.

Vários estudos investigaram os efeitos da suplementação com vit D sobre a manifestação de DM1. Granfors M. *et al.* reportaram recentemente que a suplementação com vit D durante a gravidez, não altera o risco para DM1 na descendência <sup>94</sup>, confirmando os resultados previamente obtidos no modelo NOD <sup>95,96</sup>. Foram encontrados resultados semelhantes no caso

da suplementação de grávidas com multivitamínicos <sup>97,98</sup>. Nos países escandinavos a suplementação de vit D foi durante muito tempo feita através do óleo de fígado de bacalhau de modo a prevenir o raquitismo associado ao défice de vit D. Na Noruega observaram que a suplementação de grávidas com óleo de fígado de bacalhau diminuía também o risco de DM1 na descendência <sup>98</sup>, assim como crianças suplementadas com óleo de fígado de bacalhau apresentaram um risco inferior para a DM1, do que as não suplementadas <sup>98</sup>. A suplementação de animais NOD com vit D diminuiu em 66% o risco de desenvolver DM1 <sup>99</sup>, mas a prevenção da DM1 só é observada no caso da administração de 800 UI/dia ser iniciada após a amamentação e mantida durante a vida <sup>95,100</sup>, levantando questões em relação à dose e duração de suplementação adequadas. No NOD, a hipercalcémia e a desmineralização óssea surgem como efeitos secundários à suplementação com a dose de calcitriol necessária para obtenção dos efeitos imunitários desejados. Esta questão dificultou a translação da dose do modelo animal para o humano, mas foi ultrapassada através do desenvolvimento de análogos do calcitriol. Alguns dos análogos já foram testados em humanos e mostraram ser mais eficazes contra a DM1 do que o composto original, nomeadamente os análogos TX527 <sup>101</sup> e BXL-219 <sup>102</sup>.

Em relação à duração ideal da suplementação em humanos, um estudo caso-controlo reporta a diminuição de 33% do risco para DM1, em crianças suplementadas durante o primeiro ano de vida <sup>103,104</sup>. A suplementação regular com doses  $\geq 2000$  UI/dia confere às crianças maior protecção contra a DM1 do que doses inferiores, com diminuição de 80% do risco para DM1 <sup>105</sup>. A dose utilizada é mais eficaz contra a DM1 do que a fornecida pelo óleo de fígado de bacalhau (400 UI/dia) <sup>103</sup>.

A vit D protege contra a DM1 promovendo a manutenção da actividade das células B através do aumento da capacidade supressora das Treg <sup>106</sup>. Doentes com DM1 e níveis de peptídeo-C ainda doseáveis, suplementados com vit D (2000 UI/dia) durante 6 meses, preservaram por mais tempo a função das células B <sup>107</sup>. Ao nível do controlo glicémico, a suplementação com vit D diminuiu o valor de HbA1c <sup>93,108</sup>. Num dos estudos, 3 meses após o fim da suplementação, os níveis de HbA1c regressaram aos maus valores iniciais, sugerindo que a deterioração do controlo glicémico é consequência da falta de vit D <sup>108</sup>. A progressão da DM1 está associada ao aparecimento de comorbilidades como a retinopatia diabética, a comorbilidade mais comum em pessoas com défice de vit D. A suplementação com vit D reduz em 18% o risco de microalbuminúria protegendo da progressão para nefropatia diabética <sup>109</sup>.

Existem estudos que contrariam a associação entre os níveis de vit D e a DM1 e os efeitos benéficos da suplementação <sup>98,110,111</sup>, mas nenhum reporta o aumento do risco para a DM1. Assim, a suplementação com vit D é considerada segura, devendo ser proposta como estratégia de prevenção terapêutica principalmente nos grupos de crianças de risco, com pouca exposição solar, história familiar de DM1 ou outras doenças autoimunes. Em 2012 <sup>112</sup> avaliou-se o efeito da administração de calcidiol como terapia adjuvante à insulino-terapia em doentes DM1. Os doentes tratados com três doses diárias de insulina foram divididos: um grupo suplementado com calcidiol (2000 UI/dia) e outro sem suplementação. O grupo

suplementado mostrou melhorias no controlo glicémico após 6 meses e a percentagem de células Treg aumentou passado 1 ano. Estes resultados superam os obtidos em regime de monoterapia com vit D, sugerindo que a combinação terapêutica insulina-vit D é benéfica e segura e deixando claro o potencial terapêutico da vit D, como adjuvante da insulinoterapia, na prevenção da DM1.

### 1.2.5. Estudos genéticos de associação entre a vitamina D e a diabetes mellitus tipo 1

O desenvolvimento das técnicas de análise genética contribuiu para o melhor entendimento da base genética de doenças poligénicas, como é o caso da DM1. Os grandes estudos de associação genética (GWAS) têm identificado polimorfismos em genes que antes não se sabia estarem implicados na doença, contribuindo para o esclarecimento do mecanismo da doença. Geralmente, os polimorfismos identificados não são a causa da doença mas identificam regiões genómicas onde podem existir variantes causais. Como já referido, variantes nos genes *HLA* classe II representam 50% da susceptibilidade genética à DM1. Além destes, foram já identificados mais de 40 loci, compreendendo mais de 300 genes, significativamente associados com a susceptibilidade para a DM1, embora cada variante isolada tenha um efeito reduzido sobre o risco de desenvolver DM1 <sup>113</sup>. No que diz respeito a estudos de associação genética entre os genes do metabolismo da vit D e o desenvolvimento da DM1, a maioria incide sobre a associação entre 4 polimorfismos (FokI, BsmI, ApaI e TaqI) <sup>114</sup> do gene *VDR* e a incidência de DM1. Por comparação, são poucos os estudos que analisam a influência de polimorfismos candidatos, presentes nos genes das enzimas responsáveis pelo metabolismo da vit D (*DHCR7*, *CYP2R1*, *CYP27B1* e *CYP24A1*) na susceptibilidade para a DM1. No entanto, por exemplo, num estudo Alemão o SNP *CYP2R1*-rs10741657 (A>G) mostrou estar significativamente associado com a DM1, sendo o alelo G considerado de risco para a DM1 e aquele que tende a ser transmitido à descendência. O genótipo GG é significativamente ( $p=0,03$ ) mais frequente no grupo de doentes DM1 e doentes portadores deste genótipo ou GA apresentam níveis de vit D inferiores aos observados na presença do genótipo AA <sup>115,116</sup>. O polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 (T>G) afecta os níveis de vit D, especificamente, o genótipo raro GG está associado a níveis de vit D inferiores em comparação com outros genótipos <sup>117</sup>. Em 2013 <sup>118</sup>, este polimorfismo foi também associado ao aparecimento dos autoanticorpos característicos da DM1, sugerindo, que este gene desempenha um papel no início do processo autoimune, influenciando o risco para a DM1, assim como variantes no gene *CYP27B1* (rs4646536, rs10877013) <sup>119</sup>. Por outro lado, na Dinamarca, ao contrário do que se esperava, não foi identificada qualquer associação entre SNP's nos genes *DHCR7*, *CYP2R1* e *CYP24A1* e a susceptibilidade genética para a DM1, com apenas uma excepção para o polimorfismo presente no gene da proteína DBP (rs2282679) <sup>120</sup>. Os resultados inconsistentes entre as diferentes populações estudadas, podem ser uma consequência das diferenças étnicas ou há ainda a possibilidade de os polimorfismos associados à DM1 serem herdados em desequilíbrio

de ligação como resultado das diferenças étnicas, dificultando a detecção do exacto polimorfismo de interesse e do seu efeito, uma vez que pode depender da população de estudo. Outra explicação possível para os resultados contraditórios pode assentar na variação dos factores ambientais entre as diferentes zonas do globo. Por isso, são necessários mais estudos, em diferentes populações de modo a esclarecer a influência de SNP's presentes nos genes da via de metabolismo da vit D sobre a susceptibilidade genética para a DM1.

### **1.3. Objectivo do estudo**

O objectivo deste estudo caso-controlo foi conhecer a contribuição de 3 SNP's nas proximidades ou nos genes responsáveis pela codificação de 3 enzimas essenciais para a síntese (*DHCR7*-rs12785878), hidroxilação (*CYP2R1*-rs2060793) e catabolismo (*CYP24A1*-rs6013897) da Vit D, para a susceptibilidade genética à DM1 na população da região centro de Portugal e a sua associação com as características clínicas da doença.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. População de estudo

O grupo de estudo foi formado por 320 doentes com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 (151 mulheres e 169 homens; média de idades  $28,8 \pm 10,9$  anos) residentes na região centro de Portugal. Os doentes foram recrutados no Serviço de Endocrinologia Diabetes e Metabolismo do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) e no Serviço de Endocrinologia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV), Aveiro. A recolha de dados relativos aos parâmetros clínicos (idade de diagnóstico, anticorpos, peptídeo-C, doenças autoimunes, retinopatia diabética e nefropatia diabética) foi realizada através do preenchimento de um questionário pelo médico endocrinologista.

O grupo controlo foi constituído por 486 voluntários saudáveis (240 mulheres e 246 homens; média de idades  $32,2 \pm 11,2$  anos) recrutados em postos de colheita do Instituto Português de Sangue na região centro.

Foi obtido o consentimento informado de cada participante neste estudo, que foi aprovado pela Comissão de Ética (CE-FCS-2013-017 e CE-FCS-2011-003) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

### 2.2. Extracção e purificação de DNA a partir de sangue periférico

O DNA (ácido desoxirribonucleico) genómico foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico, recorrendo ao método de *salting-out* adaptado de Miller *et al.*<sup>121</sup>. O processo de extracção iniciou-se pela obtenção de cerca de 10 mL de sangue periférico colhido em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) e armazenados a 4 °C.

Após a chegada das amostras ao laboratório, as amostras sanguíneas foram colocadas num tubo de centrífuga de 50 mL. Seguidamente a lise dos eritrócitos foi levada a cabo com a adição de 30mL de tampão de lise RBC (Red Blood Cell) a 4 °C (RBC: 155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 20 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7,4). A mistura foi agitada e mantida no gelo por 15 minutos, realizando inversões frequentes, seguindo depois para centrifugação a 2500 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos a 4 °C (Allegra™ X-22R, Beckman Coulter, Fullerton, Ca, EUA). O procedimento de adição do tampão de lise, manutenção no gelo e centrifugação foi repetido até que o sedimento de células apresentasse uma cor branca.

O passo seguinte teve como objectivo a lise dos leucócitos, começando com a ressuspensão do sedimento de células obtido anteriormente. Uma vez ressuspendido, procedeu-se à adição de 5mL de tampão SE (secondary extraction) (SE: 75 mM NaCl; 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8,0), 12,5

$\mu\text{L}$  de proteínase K (20 mg/mL) e 500  $\mu\text{L}$  de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10%, ficando a mistura a incubar durante a noite (ou no mínimo 6 horas) a 55 °C num bloco térmico (Star Lab, Chennai, Índia). Durante este passo o SDS teve como função a quebra e dissolução de membranas celulares assim como a desnaturação de proteínas, auxiliada pela acção da proteínase K.

A terceira etapa deste processo diz respeito à precipitação das proteínas desnaturadas que tendem a ligar ao DNA tornando-se contaminantes. Para tal foram adicionados 3mL de NaCl (cloreto de sódio) saturado (6M) às amostras, que foram novamente incubadas a 55 °C durante 10 minutos. Posteriormente as amostras seguiram para centrifugação a 4000 rpm, 30 minutos a 15 °C, com agitação prévia por 25 segundos. A acção do NaCl passa pela sua dissociação em iões que, por sua vez, interagem com o DNA tornando este uma molécula de carga nula, não permitindo assim a formação de ligações iónicas com proteínas ou outros contaminantes.

Após esta centrifugação obteve-se um sedimento de proteínas que foi descartado, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrífuga de 50 mL. Neste novo tubo de centrífuga ocorreu a precipitação do DNA com a adição de etanol 100% a -20 °C, numa quantidade de cerca de duas vezes o volume de sobrenadante previamente obtido. Após a adição do etanol 100% e inversões frequentes do tubo foi possível observar a formação do novelo de DNA, que se formou por este ser insolúvel em álcool. Seguiu-se uma centrifugação a 4500 rpm, 5 minutos a 4 °C da qual o sobrenadante foi rejeitado, reservando o sedimento de DNA.

O sedimento de DNA obtido foi submetido a uma lavagem com a adição de 10 mL de etanol 70%, seguindo depois para nova centrifugação a 4500 rpm, 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento de DNA foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, onde permaneceu a secar cerca de 30 minutos à temperatura ambiente. Após os 30 minutos, o DNA foi reidratado com 1mL de tampão TE (Tris-EDTA:10 mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA) e colocado em agitação lenta e permanente durante a noite à temperatura ambiente.

Uma vez obtido o DNA, a sua concentração e o seu grau de pureza foram determinados através da medição da densidade óptica de cada amostra por espectrofotometria ultravioleta nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (Nanophotometer spectrophotometer B-80-3004-33, Impln GmbH, Munich, Germany). Uma vez que o DNA absorve a 260 nm e por outro lado as proteínas absorvem a 280 nm, o grau de pureza da amostra será dado pelo rácio  $A_{260}/A_{280}$  que deve apresentar um valor entre 1,8 e 2,0. Sendo que uma amostra de DNA que apresente um rácio menor que 1,8 indica contaminação por proteínas, por outro lado, uma amostra com um rácio maior que 2,0 é indicativo de contaminação por RNA. O grau de pureza é, portanto, um parâmetro de controlo do processo de extracção.

Finalmente o tubo de microcentrífuga com o DNA reidratado foi armazenado a -80 °C. Para uso diário, procedeu-se à diluição deste DNA reidratado de modo a obter uma concentração de 100 ng/ $\mu\text{L}$  num volume final de 200  $\mu\text{L}$ , posteriormente armazenado a -20 °C.

### 2.3. Reacção de polimerização em cadeia (PCR)

A técnica de PCR foi desenvolvida pelo bioquímico e prémio Nobel, Kary Mullis nos anos 80 e veio revolucionar a biologia molecular a diversos níveis, nomeadamente na área da genética molecular. Esta técnica baseia-se nos princípios da replicação do DNA, tendo como objectivo a síntese de novas cadeias de DNA complementares à cadeia molde. A síntese de novas cadeias complementares torna-se possível devido à capacidade da enzima DNA polimerase para adicionar nucleótidos onde existe um grupo hidroxilo (3'-OH). A extremidade 3'-OH necessária à adição dos novos nucleótidos é gerada com a adição de *primers* específicos, ou seja, um conjunto específico de nucleótidos complementar a uma parte da sequência de interesse de determinado gene, sendo portanto os primeiros nucleótidos a ser inseridos na nova cadeia de DNA em formação. No final da reacção de PCR a sequência do gene de interesse terá sido amplificada exponencialmente e acumulada em biliões de cópias, *in vitro*. A amplificação das sequências de interesse dos genes *DHCR7*, *CYP2R1* e *CYP24A1* foi realizada recorrendo a *primers* específicos e a condições de PCR optimizadas, nomeadamente, a concentração de MgCl<sub>2</sub>(cloreto de magnésio) e a temperatura de *annealing* (temperatura de emparelhamento dos *primers*).

As sequências genéticas de interesse, onde se encontram os SNP's em estudo, foram amplificadas pela acção da enzima Taq (*Thermus aquaticus*) polimerase (Dream Taq Green DNA, ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Numa reacção com um volume final de 15µL foram adicionados 100ng de DNA genómico, 0,2 mM de dNTPs (Nzytech, Lisboa, Portugal), 0,25 µM de cada um dos primers (*forward* e *reverse*), 1 U de enzima Taq polimerase e o respectivo tampão contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, a água foi adicionada até perfazer o volume final da reacção.

A reacção de PCR decorreu num termociclador (T100™, Bio RAD, Hercules, CA, EUA) sendo o programa escolhido para a reacção: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguindo-se uma série de 35 ciclos compostos por 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 30 segundos a uma temperatura de emparelhamento específica, dependendo da sequência dos *primers* (Tabela 1) e 30 segundos de extensão a 72 °C. No final dos 34 ciclos a reacção termina com um passo de extensão final de 10 minutos à temperatura óptima da enzima Taq polimerase (72 °C). Cada amplificação realizada incluiu um controlo negativo onde o DNA foi substituído por água.

Tabela 1- Primers e condições de otimização da reacção de PCR para cada polimorfismo

Gene	SNP	Primers (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Temperatura de annealing (°C)	Fragmento (pb)
<i>DHCR7</i>	rs12785878 (T>G)	F: CCCCTGCCTTAGTGTGTGTT R: CCGGGGGCCTTTAGTTAGAC	1,5	58	618
<i>CYP2R1</i>	rs2060793 (A>G)	F:TGGAGCTGAGATCAACTGCTAAA R:GTGACACATACCTGTGGGGG	1,5	58	768
<i>CYP24A1</i>	rs6013897 (T>A)	F:GGACTCCTGGTTGGGTGATG R:TCCTTGATCCAAATGTCCGCA	1,5	58	516

SNP single nucleotide polymorphism; Sequência de primers no sentido 5' - 3'(F: foward; R: reverse); MgCl<sub>2</sub> (mM) concentração de cloreto de magnésio em mili molar; °C graus centigrados; pb pares de base

## 2.4. Digestão enzimática

Os produtos de PCR amplificados foram posteriormente submetidos a digestão enzimática, uma vez que todos os polimorfismos em estudo criaram ou retiraram um local de corte para uma endonuclease de restrição específica. A escolha da endonuclease adequada a cada SNP, foi realizada recorrendo ao programa *Nebcutter 2.0* disponível na Internet (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

Uma vez escolhida a enzima de interesse, o DNA previamente amplificado por reacção de PCR seguiu para digestão enzimática de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante das enzimas (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EUA).

As enzimas seleccionadas para o estudo dos SNP's *DHCR7*-rs12785878, *CYP2R1*-rs2060793 e *CYP24A1*-rs6013897 foram: enzima *TaqI*, enzima *SchI* e enzima *TscAI* respectivamente.

A enzima *TaqI* permitiu distinguir os três genótipos possíveis para o SNP rs12785878 (T>G) localizado no intrão 2 do gene *DHCR7*. O genótipo TT não apresentou local de corte para a enzima logo gerou-se apenas um fragmento com 618pb. Por outro lado para o genótipo homozigótico GG foi criado um local de corte para a enzima *TaqI*, gerando 2 fragmentos (320 e 298 pb) e no genótipo heterozigótico TG, foram observados 3 fragmentos (618,320 e 298 pb) (Tabela 2). A digestão de 10µL de produto de PCR ocorreu num volume final de reacção de 15µL, sendo os 5µL adicionados compostos por 2,5 U de *TaqI*, *Buffer TaqI* 10x (1,5µL) e o restante volume completo com água. Após a adição da enzima, os produtos de PCR foram incubados por 2 horas a 65°C.

A endonuclease escolhida para o estudo do SNP rs2060793 (G>A) do gene *CYP2R1* foi a enzima *SchI*. O genótipo mais comum, GG, produziu 3 fragmentos (379,248 e 141 pb). O genótipo homozigótico AA eliminou um local de corte da enzima, gerando apenas 2 fragmentos (627 e 141pb). Como tal o genótipo heterozigótico GA foi representado pela presença de 4 fragmentos (627, 379, 248 e 141 pb) (Tabela II). Na reacção de digestão enzimática o volume final de 15µL foi composto por 10µL de produto de PCR e 5µL que contém 2,5 U de enzima *SchI*, *Buffer Tango* 10x (1,5µL) e água. O protocolo de digestão efectuada começou com um

período de incubação a 37°C durante 2 horas, seguido de um período de inactivação enzimática a 65°C por 20 minutos.

O SNP rs6013897 (T>A) localizado no gene *CYP24A1* foi estudado utilizando a enzima TscAI. Na presença do genótipo mais comum, TT, a sequência apresentou 2 locais de corte para a enzima em causa, gerando 3 fragmentos (222,192 e 102pb). No que diz respeito ao genótipo AA a enzima reconheceu apenas um local de corte gerando por isso 2 fragmentos (414 e 102 pb) e para o genótipo TA foram identificados 4 fragmentos (414, 222, 192 e 102pb)(Tabela II). A digestão de 10µL de produto PCR foi realizada com a adição de 2,5 U de enzima TscAI, *Buffer* Tango 10x (1,5µL) e água, perfazendo um volume de reacção final de 15µL. Após a mistura, seguiu-se a incubação a 65°C durante 3 horas.

**Tabela 2-** Polimorfismos em estudo, genótipos esperados e peso molecular dos respectivos fragmentos gerados por restrição enzimática

SNP	Fragmento amplificado (pb)	Enzima de restrição (2,5U)	Genótipo	Fragmentos gerados (pb)
rs12785878 (T>G)	618	TaqI	TT	618
			TG	618, 320, 298
			GG	320, 298
rs2060793 (A>G)	768	SclI	GG	379, 248, 141
			GA	627, 379, 248, 141
			AA	627,141
rs6013897 (T>A)	516	TscAI	TT	222, 192, 102
			TA	414, 222, 192, 102
			AA	414, 102

SNP single nucleotide polymorphism; pb pares de base; U unidades

## 2.5. Electroforese em gel de agarose

A técnica de electroforese foi utilizada numa primeira fase com objectivo de confirmar a amplificação enzimática por PCR. No fim da reacção de PCR, 5µL dos produtos obtidos foram carregados num gel de agarose (GRS Agarose LE, grisp) com concentração de 1% (m/v). O gel foi preparado através do aquecimento da mistura agarose e tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA 1X: 40mM Tris-trisaminometano; 20mM ácido acético; 1mM EDTA) 1X e posteriormente corado com *GreenSafe* (GreenSafe Premium, nzytech) (1µL/1mL). Além das amostras no gel, foi também carregado um marcador de peso molecular (HyperLadder II, Bionline or VC 100bp Plus DNA Ladder, Vivantis) para facilitar a confirmação dos fragmentos obtidos através do seu peso molecular.

Numa segunda fase, a electroforese foi usada para correr os produtos de PCR submetidos a digestão enzimática. O objectivo desta electroforese foi observar os fragmentos gerados pelos cortes das enzimas de modo a determinar o genótipo de cada amostra.

Para tal foi necessário ajustar a concentração de agarose aos tamanhos dos fragmentos esperados. Para os SNP's *DHCR7*-rs12785878 e *CYP2R1*-rs2060793 a electroforese ocorreu num gel de agarose 2% (m/v), no caso do SNP *CYP24A1*-rs6013897 o gel preparado foi de 3% (m/v).

Após a realização do respectivo gel de agarose, em tampão TAE 1X e corado com *GreenSafe*, procedeu-se ao carregamento das amostras (9 $\mu$ L) assim como do marcador de peso molecular. Após o carregamento das amostras no gel, foram definidos os parâmetros de corrida, ou seja a voltagem e o tempo de corrida. No caso do gel de agarose 1% (m/v) o tempo de corrida definido foi de 25 minutos a uma voltagem de 180mV. Os géis carregados com amostras digeridas correram a uma voltagem de 180mV, por um período de tempo entre 40 minutos a 1 hora.

No final do tempo definido para a electroforese os fragmentos foram observados sobre luz UV num transiluminador (UVITEC system Cambridge) e as imagens obtidas foram arquivadas para posterior análise de resultados.

## 2.6. Sequenciação de DNA

De modo a confirmar e validar o método de genotipagem utilizado foram sequenciadas amostras representativas dos três génotipos possíveis para cada polimorfismo.

Em 1977, Sanger *et al.* descreveram o método de sequenciação de Sanger o qual teve como objectivo a identificação da sequência exacta de nucleótidos presente em determinada amostra. Este método requer uma cadeia simples de DNA molde, um primer, a enzima DNA polimerase, dNTPs e ddNTPS (didesoxinucleótidos trifosfatados). Os ddNTPS diferem dos dNTPs na sua extremidade 3', onde não existe o grupo hidroxilo (-OH) necessário para a formação da ligação fosfodiéster com o próximo nucleótido a ser adicionado. A ausência deste grupo 3'-OH faz com que a enzima DNA polimerase deixe de ter capacidade de adição de novos nucleótidos logo, para a síntese da nova cadeia de DNA sempre que um ddNTP é incorporado, deste modo iremos obter diferentes fragmentos que distam entre si em apenas um nucleótido. As cadeias obtidas são submetidas a electroforese capilar para determinar a sequência de bases de DNA.

Actualmente este processo está facilitado devido a equipamentos de sequenciação automática de DNA. Estes equipamentos possuem detectores de fluorescência, tornando possível a distinção dos quatro marcadores fluorescentes para timinas, adeninas, citosinas e guaninas. Os ddNTPs que se encontram em concentrações mais baixas do que os dNTPs, são incorporados aleatoriamente na cadeia provocando a interrupção da síntese de DNA. Neste caso, como cada um dos quatro ddNTPs tem na sua composição um fluorocromo que emite a um comprimento de onda específico, torna-se possível a identificação de cada fragmento truncado após a sua migração através do gel de electroforese. Assim a sequência de nucleótidos de DNA pode ser determinada pela ordem em que cada fragmento passa pelo detector de fluorescência.

Antes da reacção de sequenciação, procedeu-se à amplificação da cadeia de DNA de interesse por reacção de PCR (descrita no ponto 2.3.). Os restantes 10 $\mu$ L de produto de PCR foram purificados enzimaticamente de modo a degradar sequências de DNA em cadeia simples que

pu dessem interferir na correcta leitura dos fragmentos sequenciados. A purificação foi realizada através da acção das enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina (EXO-SAP, Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA) numa proporção de 1:2. Assim, adicionou-se a cada amostra 0,5µL de EXO e 1µL de SAP, posteriormente a mistura foi submetida a dois períodos de incubação, um de 20 minutos a 37°C seguido de 20 minutos a 80°C.

Uma vez o DNA purificado, seguiu-se a reacção de sequenciação de DNA. Para cada amostra foram realizadas duas reacções, uma com o *primer forward* e outra com o *primer reverse* em diferentes tubos. Os *primers* utilizados na reacção de sequenciação foram os mesmos utilizados na reacção de PCR. Cada reacção de 11µL foi preparada com 2 µL de DNA (100ng/µL), 0,25µL de primer e entre 1 a 4 µL de DTCS Quick Start Master Mix (GenomeLab, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA), dependendo do comprimento do fragmento em estudo, sendo que para fragmentos maiores será necessário uma maior quantidade de *Master Mix*. A reacção de sequenciação decorreu num termociclador com um período de desnaturação inicial de 6 minutos a 96°C, 20 segundos a 55°C para emparelhamento dos *primers* e 40 segundos de extensão a 60°C, programa que se repetiu durante 30 ciclos. No final dos ciclos decorreu um período de 8 minutos para extensão final a 60°C.

Após a reacção de sequenciação de DNA, foi realizada a precipitação das amostras obtidas. Para tal, realizou-se uma solução de precipitação constituída por acetato de sódio, EDTA e glicogénio. Assim, em cada reacção adicionou-se 1,2µL de acetato de sódio (3M, pH 5,2), 1,2µL de EDTA (100mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0), 0,6µL de glicogénio (20mg/mL) e 60 µL de etanol 95% gelado. A mistura obtida foi centrifugada a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Para lavagem do sedimento obtido foram adicionados 200 µL de etanol 70%, seguindo-se uma nova centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Nesta fase repete-se o processo de lavagem com etanol 70%. No final da centrifugação o etanol em excesso foi retirado e o sedimento foi deixado a secar à temperatura ambiente. No passo seguinte, cada sedimento foi ressuspendido em 10µL de SLS (*Sample Loading Solution*) de modo a manter a cadeia de DNA desnaturada durante a sequenciação. O produto obtido foi submetido à electroforese capilar num sequenciador automático de DNA (GenomeLab TM GeXP, Genetic Analysis System, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA).

O método utilizado para sequenciar as amostras compreendeu uma temperatura capilar de 50°C, uma temperatura de desnaturação de 90°C durante 120 segundos, uma voltagem de injeção de 2,0 kV durante 15 segundos e uma voltagem de separação de 4,0 kV durante um determinado período de tempo, dependendo do comprimento do fragmento.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de referência existentes no *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) usando o programa de análise *GenomeLab Genetic Analysis System software* (Version 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA).

## 2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada de modo a avaliar a associação entre os três polimorfismos estudados e a susceptibilidade genética para o desenvolvimento de DM1. As frequências alélicas e genotípicas de cada polimorfismo em doentes e controlos foi determinada por contagem directa.

Para cada polimorfismo o desvio entre as frequências genotípicas obtidas e esperadas foi calculado através do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE), para os controlos. A avaliação do HWE foi realizada calculando as frequências genotípicas esperadas e comparando-as com as frequências observadas na população em estudo. O HWE baseia-se em quatro requisitos principais: i) existe reprodução sexuada aleatória; ii) as frequências alélicas são conservadas de geração em geração ou seja, a população é geneticamente estável sem o aparecimento de mutações; iii) não existem efeitos migratórios significantes; iv) a população apresenta efeitos de selecção natural e derivação genética desprezáveis. Os requisitos foram assumidos como verdade para o cálculo das frequências genotípicas esperadas. A concordância entre os valores observados e os valores esperados foi testada pelo teste de qui-quadrado *goodness-of-fit* através da utilização do programa *SNPstats*.

As frequências alélicas e genotípicas entre o grupo controlo e o grupo de doentes, foram comparadas por regressão logística utilizando o programa disponível online, *SNPstats*<sup>122</sup> (<https://www.snpstats.net/snpstats/start.htm>). Obtivemos os valores de odds ratio (OR) que permitiram estimar o risco associado a determinado alelo, com um intervalo de confiança (IC) de 95%. Posteriormente, estes parâmetros foram ajustados consoante o género e idade. O melhor modelo hereditário para cada polimorfismo (codominante, dominante, recessivo, *overdominant* e aditivo) foi seleccionado através do critério de informação *Akaike* (AIC) fornecido pelo *SNPstats*, tendo sido considerado o melhor modelo aquele que apresentou um menor valor de AIC. O mesmo método de análise estatística foi aplicado na comparação dos subgrupos construídos para a análise dos diversos parâmetros clínicos, de modo a conhecer o efeito dos polimorfismos sobre a idade de diagnóstico, o género, a presença do anticorpo anti-GAD65, o valor de peptídeo-C, a existência de outras doenças autoimunes, a nefropatia diabética e a retinopatia diabética. A significância estatística foi estabelecida para um valor de  $p < 0,05$  e corrigida para comparações múltiplas (três) usando o método de Bonferroni (3 SNP's  $p$  corrigido =  $0,05/3 = 0,017$ ).

## 3. Resultados

### 3.1. Polimorfismo *DHCR7*

A amplificação do intrão 2 do gene *DHCR7* por PCR foi realizada de modo a permitir a análise do SNP rs12785878 (T>G). Após o PCR foi obtido um fragmento de DNA com 618 pb, observado após a electroforese realizada num gel de agarose com concentração de 1% (Figura 5A). Uma vez amplificado o fragmento de interesse e a verificação de ausência de contaminação dos produtos de PCR, as amostras seguiram para digestão enzimática. A técnica de digestão enzimática permitiu a genotipagem do SNP rs12785878, uma vez que pela acção da enzima TaqI foi possível distinguir os três genótipos diferentes. O genótipo TT originou um único fragmento (618pb), o genótipo homozigótico GG originou 2 fragmentos (298 e 320pb) e o genótipo heterozigótico TG originou 3 fragmentos (298, 320 e 618pb), como representado na Figura 5B. De modo a confirmar os resultados dos genótipos obtidos foi realizada a sequenciação de DNA de uma amostra representativa de cada genótipo (Figura 5C).

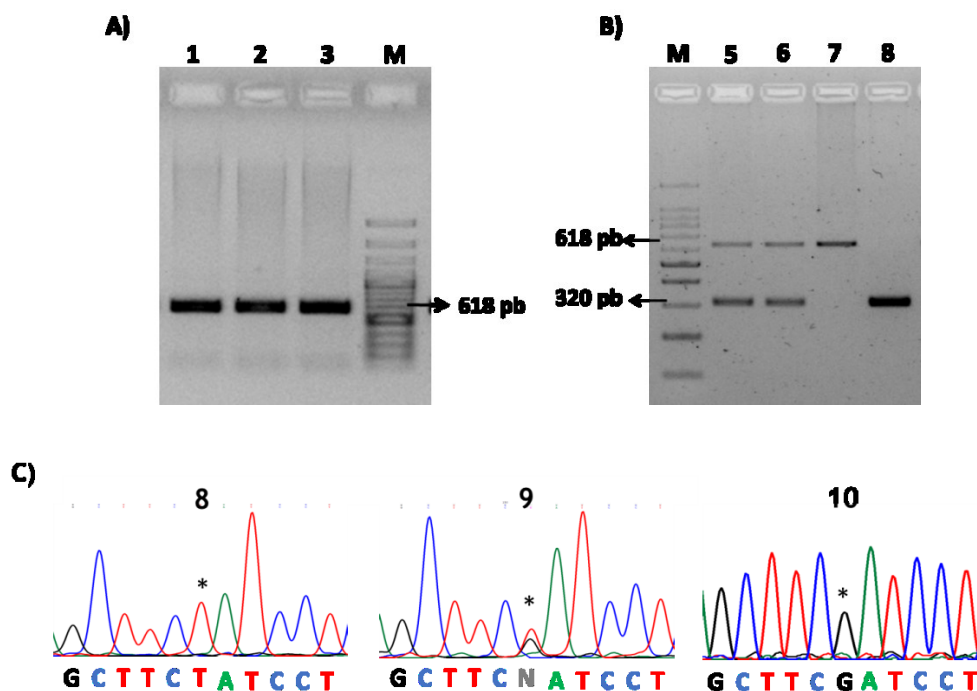


Figura 5- Genotipagem do polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 (T>G); A: Gel de agarose 1%, electroforese de produtos de PCR contendo parte do intrão 2 do gene *DHCR7*; 1 a 3 banda de 618pb representando o fragmento de interesse do intrão 2 amplificado por reacção de PCR; M - marcador de peso molecular. B: Gel de electroforese com 2% de agarose, representação dos 3 genótipos possíveis para o SNP rs12785878 obtidos por digestão enzimática com TaqI; M - marcador de peso molecular, 5 e 6 - Genótipo heterozigótico TG representado por 2 bandas no gel (618pb e 320pb), 7- genótipo homozigótico comum TT caracterizado pela presença de uma banda intacta no gel (618pb), 8- genótipo GG homozigótico resulta numa banda no gel (320pb). C: Cromatogramas de amostras representativas dos diferentes genótipos possíveis para o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878; 8- Genótipo homozigótico TT; 9- Genótipo heterozigótico TG; 10- Genótipo homozigótico GG;

### 3.2. Polimorfismo *CYP2R1*

O polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793 (G>A) está localizado numa zona *upstream* do gene *CYP2R1*, esta foi amplificada por PCR com a obtenção de um fragmento total de 768pb, visualizado num gel de agarose após a electroforese (Figura 6A). Posteriormente os produtos de PCR obtidos foram submetidos a digestão enzimática com a enzima SchI, capaz de distinguir os três genótipos, representados na Figura 6B. O genótipo homozigótico GG é identificado pela presença de três fragmentos (141,248,379pb), o genótipo homozigótico AA pela presença de 2 fragmentos (141 e 627pb) e o genótipo heterozigótico AG pela presença de 4 fragmentos (141,248,379 e 627pb). O DNA de uma amostra representativa de cada genótipo foi sequenciado com o objectivo de confirmar os resultados previamente obtidos por digestão enzimática (Figura 6C).

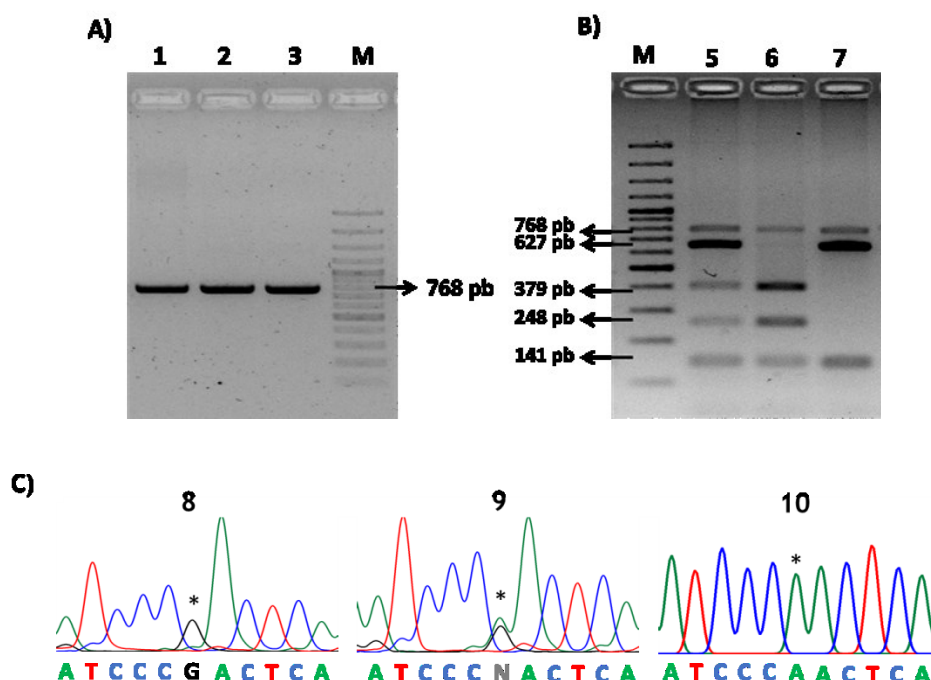
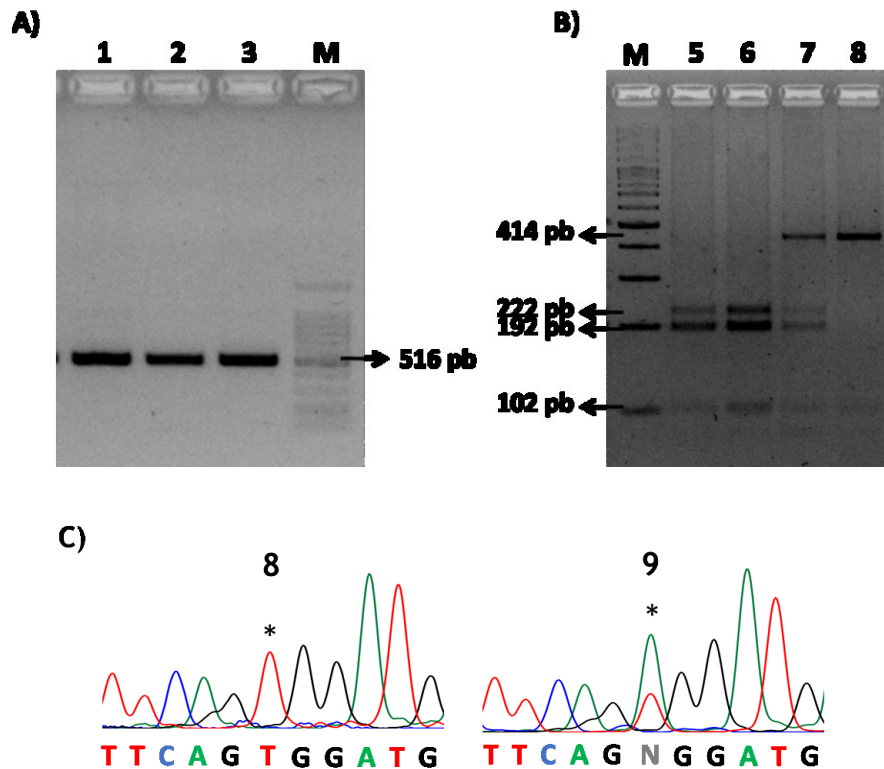


Figura 6- Genotipagem do polimorfismo *CYP2R1*- rs2060793 (G>A); A: Gel 1% de agarose, electroforese de produtos da reacção de PCR; 1-3 banda representativa da amplificação do fragmento de interesse onde se encontra o SNP em estudo (768pb); M- marcador de peso molecular; B: Gel 2% de agarose, mostra o resultado da electroforese dos produtos obtidos da digestão enzimática com a enzima SchI; M -marcador de peso molecular; 5- Genótipo heterozigótico GA representado pela presença de 4 bandas no gel (141, 248, 379 e 627 pb); 6- Genótipo homozigótico comum GG caracterizado por 3 bandas (141, 248 e 379pb); 7- genótipo homozigótico AA apenas apresenta 2 bandas no gel (141 e 627pb); C: Cromatogramas de amostras representativas dos diferentes genótipos possíveis para o polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793; 8- Genótipo homozigótico GG; 9- Genótipo heterozigótico AG; 10- Genótipo homozigótico AA.

### 3.3. Polimorfismo *CYP24A1*

Os genótipos respeitantes ao SNP rs6013897 (T>A), localizado numa zona intergénica próximo do gene *CYP24A1*, foram analisados após a amplificação da zona de interesse por PCR. Os

produtos de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose e posteriormente visualizado o fragmento obtido de 516pb (Figura 7A). Seguidamente decorreu a digestão enzimática dos produtos de PCR com a enzima TscAI permitindo a distinção dos três genótipos. O genótipo homocigótico TT é representado por três fragmentos (102,192,222 pb), por sua vez o genótipo homocigótico AA é representado por 2 fragmentos (102 e 414 pb) e o genótipo heterocigótico TA é representado por 4 fragmentos (102,192,222,e 414 pb), como demonstrado na Figura 7B. Os três genótipos foram confirmados através da sequenciação de DNA de três amostras representativas (Figura 7C).



**Figura 7- Genotipagem do polimorfismo CYP24A1- rs6013897 (T>A);** A: Gel de agarose 1%, electroforese de produtos da reacção de PCR de amplificação de fragmento intergénico de interesse; 1- 3 : banda representativa do fragmento de interesse (516pb); M- marcador de peso molecular; B: Gel de electroforese 3% mostrando os 3 genótipos relativos ao SNP rs6013897, após digestão enzimática com a enzima TscAI; M-marcador de peso molecular; 5 e 6 - genótipo homocigótico comum TT representado no gel por 3 bandas (102, 192 e 222 pb); 7- representa o genótipo heterocigótico TA pela presença de 4 bandas (102,192,222 e 414pb); 8- genótipo homocigótico AA onde observamos apenas 2 bandas no gel (102 e 414pb); C: Cromatogramas de amostras representativas dos diferentes genótipos possíveis para o polimorfismo CYP24A1-rs6013897; 8- Genótipo homocigótico TT; 9- Genótipo heterocigótico TA;

### 3.4. Análise estatística

#### 3.4.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)

O teste do equilíbrio de HWE segue determinados pressupostos, anteriormente referidos, de modo a testar a hipótese de a amostra em estudo ser representativa da população geral. O

teste de HWE foi realizado com o objectivo de verificar se a população de controlo em estudo segue os pressupostos desta lei. Assim, foi realizada a contagem directa da frequência dos genótipos observados no grupo controlo e posteriormente os valores esperados foram calculados. Ou seja, para um genótipo composto pelo alelo G e o alelo A, onde a frequência do alelo G é  $p$ , a frequência do alelo A será  $q = (1-p)$ , então os valores esperados para os genótipos GG, AG e AA serão  $p^2$ ,  $2pq$  e  $q^2$ , respectivamente. A comparação das frequências genotípicas entre os valores observados e os esperados foi realizada para os três polimorfismos, utilizando o programa *SNPstats*. Os valores de  $p$  verificados para o equilíbrio de HWE não foram significativos para nenhum dos polimorfismos, indicando que as frequências genotípicas observadas na população controlo não se desviam significativamente das frequências esperadas, segundo os pressupostos do HWE.

### 3.4.2. Análise dos polimorfismos

Antes da análise dos resultados relativamente a parâmetros específicos como idade ou género, foi realizada a comparação global entre o grupo de doentes e o grupo controlo. Para esta análise toda a população de estudo foi incluída, 320 doentes e 486 controlos. A comparação entre o grupo de doentes e o grupo de controlos não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos para os polimorfismos *DHCR7*-rs12785878 e *CYP24A1*-rs6013897. Os resultados obtidos para o polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793 mostram diferenças significativas em relação às frequências genotípicas ( $p=0,02$ ) e alélicas ( $p=0,03$ ), sendo que a presença do alelo A é mais frequente no grupo de doentes (Tabela 3).

Tabela 3- Análise das frequências genotípicas e alélicas dos doentes e controlos

Polimorfismo	Genótipo /Alelo	Doentes n(%) N=320	Controlos n(%) N=486	OR	95% IC	Valor de $p$
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	103 (32)	163 (38)	1,16	0,80 - 1,69	0,42
	TG	155 (49)	199 (46)			
	GG	60 (19)	72 (17)			
	T	361 (57)	525 (60)	1,16	0,94 - 1,43	0,15
	G	275 (43)	343 (40)			
<i>CYP2R1</i> rs2060793	GG	105 (33)	165 (38)	1,61	1,06 - 2,44	0,02
	AG	158 (50)	219 (50)			
	AA	56 (18)	51 (12)			
	G	368 (58)	549 (63)	1,26	1,02 - 1,59	0,03
	A	270 (42)	321 (37)			
<i>CYP24A1</i> rs6013897	TT	180 (58)	249 (61)	1,33	0,69 - 2,56	0,39
	TA	114 (36)	142 (35)			
	AA	19 (6)	19 (5)			
	T	474 (76)	640 (78)	1,14	0,89 - 1,45	0,30
	A	152 (24)	180 (22)			

N número total de indivíduos; n número de indivíduos; OR odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos ou alelos como referência); IC intervalo de confiança; Valores ajustados consoante o género e idade para os genótipos: *DHCR7*  $p=0,28$  (OR 1,23; 95% IC 0,84 - 1,82); *CYP2R1*  $p=0,03$  (OR 1,61; 95% IC 1,05 - 2,44); *CYP24A1*  $p=0,42$  (OR 1,31; 95% IC 0,68 - 2,63); Valores ajustados

consoante o género e idade para os alelos: *DHCR7*  $p=0,1$  (OR 1,19; 95% IC 0,96 - 1,47); *CYP2R1*  $p=0,04$  (OR 1,27; 95% IC 1,01 - 1,56); *CYP24A1*  $p=0,4$  (OR 1,11; 95% IC 0,86 - 1,45)

### 3.4.3. Análise da idade de diagnóstico

De modo a avaliar a influencia dos polimorfismos na idade de diagnóstico, o grupo de doentes foi dividido em dois grupos. O primeiro grupo composto pelos doentes com idade de diagnóstico  $\leq 18$  anos ( $N=157$ ), o segundo grupo com doentes com idade diagnóstica  $>18$  anos ( $N=84$ ). Posteriormente, foi realizada a comparação das frequências genotípicas e alélicas dos três polimorfismos em estudo. Os resultados mostram uma ligeira diferença das frequências genotípica ( $p=0,05$ ) e alélica ( $p=0,04$ ) para o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878. Para os restantes dois polimorfismos estudados não foram obtidas diferenças significativas (Tabela 4).

Tabela 4- Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante a idade de diagnóstico

Polimorfismo	Genótipo/ Alelo	Idade de diagnóstico $\leq 18$	Idade de diagnóstico $>18$	OR	95% CI	Valor de $p$
		n(%) N=157	n(%) N=84			
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	59 (38)	24 (29)	0,52	0,26 - 1,00	0,05
	TG	75 (48)	39 (46)			
	GG	23 (15)	21 (25)			
	T	193 (61)	87 (52)	0,68	0,46 - 0,99	0,04
	G	121 (39)	81 (48)			
<i>CYP2R1</i> rs2060793	GG	52 (33)	26 (31)	0,53	0,26 - 1,07	0,08
	AG	85 (54)	40 (48)			
	AA	20 (13)	18 (21)			
	G	189 (60)	92 (55)	0,79	0,53 - 1,16	0,23
	A	125 (40)	76 (45)			
<i>CYP24A1</i> rs6013897	TT	81 (54)	51 (62)	1,09	0,36 - 3,33	0,88
	TA	60 (40)	26 (32)			
	AA	10 (7)	5 (6)			
	T	222 (74)	128 (78)	1,28	0,81 - 2,00	0,28
	A	80 (26)	36 (22)			

N número total de indivíduos; n número de indivíduos; OR odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos ou alelos como referência); IC intervalo de confiança;

### 3.4.4. Análise de género

Esta análise foi realizada dividindo o grupo de doentes em doentes masculinos ( $N=169$ ) e doentes femininos ( $N=151$ ). As frequências genotípicas e alélicas foram comparadas para os polimorfismos de interesse. Os resultados obtidos mostram diferenças estatisticamente significativas entre os géneros nas frequências genotípicas do polimorfismo do gene *DHCR7* ( $p=0,04$ ) e para o polimorfismo do gene *CY24A1* ( $p=0,02$ ). As diferenças são também observadas para as frequências alélicas do SNP *DHCR7*-rs12785878 com um valor de  $p=0,03$ . Os resultados obtidos para o SNP *CYP2R1*-rs2060793 não mostraram diferenças significativas das frequências genotípicas e alélicas entre os doentes homens e mulheres (Tabela 5).

**Tabela 5-** Análise das frequências genóticas e alélicas dos doentes consoante o género

Polimorfismo	Genótipo /Alelo	Homens n(%) N=169	Mulheres n(%) N=151	OR	95% CI	Valor de p
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	48 (29)	55 (37)	1,85	1,03 - 3,33	0,04
	TG	81 (48)	74 (49)			
	GG	39 (23)	21 (14)			
	T	177 (53)	184 (61)	1,43	1,04 - 1,96	0,03
	G	159 (47)	116 (39)			
<i>CYP2R1</i> rs2060793	GG	55 (33)	50 (33)	1,33	0,75 - 2,38	0,32
	AG	81 (48)	77 (51)			
	AA	33 (20)	23 (15)			
	G	191 (57)	177 (59)	1,11	0,81 - 1,51	0,52
	A	147 (43)	123 (41)			
<i>CYP24A1</i> rs6013897	TT	84 (52)	92 (63)	1,75	1,08 - 2,77	0,02
	TA	70 (43)	44 (30)			
	AA	9 (6)	10 (7)			
	T	238 (73)	228 (78)	1,32	0,91 - 1,92	0,14
	A	88 (27)	64 (22)			

N número total de indivíduos; n número de indivíduos; OR odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos ou alelos como referência); IC intervalo de confiança;

### 3.4.5. Análise do autoanticorpo anti-GAD65

O autoanticorpo anti-GAD65 é o anticorpo mais frequente no grupo de doentes. Foi avaliada a existência de diferenças das frequências genóticas e alélicas entre o grupo de doentes com anticorpos anti-GAD65 (N=69) e o grupo de doentes sem estes anticorpos (N=32). Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa nas frequências genóticas entre os grupos para o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 ( $p=0,005$ ), mas a diferença não se manteve na comparação das frequências alélicas ( $p=0,55$ ). Em relação aos restantes polimorfismos em estudo, não houve diferenças significativas detectadas (Tabela 6).

**Tabela 6-** Análise das frequências genóticas e alélicas consoante a presença ou ausência do anticorpo anti-GAD65

Polimorfismo	Genótipo/ Alelo	Com anti-GAD65 n(%) N=69	Sem anti-GAD65 n(%) N=32	OR	95% CI	Valor de p
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	19 (28)	15 (47)	3,57	1,43 - 9,09	0,005
	TG	40 (58)	9 (28)			
	GG	10 (14)	8 (25)			
	T	78 (57)	39 (61)	1,20	0,65 - 2,17	0,55
	G	60 (43)	25 (39)			
<i>CYP2R1</i> rs2060793	GG	21 (30)	7 (22)	0,57	0,24 - 1,37	0,20
	AG	36 (52)	21 (66)			
	AA	12 (17)	4 (12)			
	G	78 (57)	35 (55)	0,92	0,48 - 1,75	0,79
	A	60 (43)	29 (45)			
<i>CYP24A1</i> rs6013897	TT	36 (55)	19 (61)	2,44	0,27 - 20,0	0,38
	TA	25 (38)	11 (35)			
	AA	5 (8)	1 (3)			
	T	97 (73)	49 (79)	1,35	0,66 - 2,78	0,40
	A	35 (27)	13 (21)			

N número total de indivíduos; n número de indivíduos; OR odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos ou alelos como referência); IC intervalo de confiança;

### 3.4.6. Análise do valor de peptídeo-C

O parâmetro clínico do valor de peptídeo-C foi também avaliado. O grupo de doentes foi dividido em doentes com valores de peptídeo-C baixos (N=93) e doentes com valores de peptídeo-C normais (N=30) e a comparação das frequências genotípicas e alélicas entre os dois grupos foi realizada. Os resultados não mostram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, para nenhum dos polimorfismos em estudo (Tabela 7).

Tabela 7- Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante o valor de peptídeo-C

Polimorfismo	Genótipo /Alelo	Peptídeo-C baixo n(%) N=93	Peptídeo-C normal n(%) N=30	OR	95% CI	Valor de p
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	33 (35)	6 (20)	0,48	0,20 - 1,11	0,08
	TG	42 (45)	19 (63)			
	GG	18 (19)	5 (17)			
	T	108 (58)	31 (52)	0,77	0,43 - 1,39	0,38
	G	78 (42)	29 (48)			
<i>CYP2R1</i> rs2060793	GG	31 (33)	8 (27)	0,71	0,31 - 1,64	0,42
	AG	48 (52)	18 (60)			
	AA	14 (15)	4 (13)			
	G	110 (59)	34 (57)	0,89	0,48 - 1,67	0,72
	A	76 (41)	26 (43)			
<i>CYP24A1</i> rs6013897	TT	54 (60)	16 (53)	0,42	0,09 - 2,00	0,29
	TA	32 (36)	11 (37)			
	AA	4 (4)	3 (10)			
	T	140 (78)	43 (72)	0,72	0,37 - 1,41	0,34
	A	40 (22)	17 (28)			

N número total de indivíduos; n número de indivíduos; OR odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos ou alelos como referência); IC intervalo de confiança;

### 3.4.7. Análise de coexistência de outras doenças autoimunes

Considerando o grupo de doentes, a análise da existência de outras patologias autoimunes a par com a DM1 foi realizada comparando o grupo de doentes com outras doenças autoimunes (N=56) com o grupo de doentes que apenas apresentam DM1 (N=111). Posteriormente, foram mais uma vez comparadas as frequências genotípicas e alélicas entre os dois grupos. Da comparação realizada, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, em nenhum dos polimorfismos em estudo (Tabela 8).

**Tabela 8-** Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante a presença ou ausência de outras doenças autoimunes

Polimorfismo	Genótipo/ Alelo	Com doenças autoimunes n(%) N=56	Sem doenças autoimunes n(%) N=111	OR	95% CI	Valor de p
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	16 (29)	40 (36)	1,41	0,69 - 2,86	0,33
	TG	29 (52)	49 (44)			
	GG	11 (20)	22 (20)			
	T	61 (54)	129 (58)	1,15	0,74 - 1,81	0,54
	G	51 (46)	93 (42)			
<i>CYP2R1</i> rs2060793	GG	17 (30)	41 (37)	1,56	0,82 - 3,03	0,17
	AG	32 (57)	51 (46)			
	AA	7 (12)	19 (17)			
	G	66 (59)	133 (60)	1,04	0,65 - 1,67	0,86
	A	46 (41)	89 (40)			
<i>CYP24A1</i> rs6013897	TT	30 (56)	58 (55)	1,31	0,35 - 5,00	0,40
	TA	20 (37)	41 (39)			
	AA	4 (7)	6 (6)			
	T	80 (74)	157 (75)	1,04	0,61 - 1,75	0,89
	A	28 (26)	53 (25)			

N número de indivíduos total; n número de indivíduos; OR odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos ou alelos como referência); IC intervalo de confiança;

### 3.4.8. Análise de nefropatia Diabética

A análise deste parâmetro clínico foi levada a cabo através da divisão do grupo de doentes, em doentes com alterações a nível renal (N=57) e doentes sem alterações renais (N=168). A comparação das frequências genotípicas e alélicas foram realizadas. Desta análise nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos foi encontrada, para nenhum dos polimorfismos em estudo (Tabela 9).

**Tabela 9-** Análise das frequências genotípicas e alélicas consoante a presença ou ausência de nefropatia diabética

Polimorfismo	Genótipo/ Alelo	Com nefropatia n(%) N=57	Sem nefropatia n(%) N=168	OR	95% CI	Valor de p
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	22 (39)	54 (32)	0,75	0,40 - 1,41	0,38
	TG	26 (46)	81 (48)			
	GG	9 (16)	33 (20)			
	T	70 (61)	189 (56)	0,81	0,53 - 1,25	0,34
	G	44 (39)	147 (44)			
<i>CYP2R1</i> rs2060793	GG	16 (28)	59 (35)	1,39	0,72 - 2,70	0,32
	AG	32 (56)	82 (49)			
	AA	9 (16)	27 (16)			
	G	64 (56)	200 (60)	1,16	0,75 - 1,78	0,52
	A	50 (44)	136 (40)			
<i>CYP24A1</i> rs6013897	TT	32 (58)	92 (57)	1,72	0,49 - 6,25	0,41
	TA	19 (35)	63 (39)			
	AA	4 (7)	7 (4)			
	T	83 (75)	247 (76)	1,04	0,63 - 1,75	0,87
	A	27 (25)	77 (24)			

N número total de indivíduos; n número de indivíduos; OR odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos ou alelos como referência); IC intervalo de confiança;

### 3.4.9. Análise de retinopatia diabética

O grupo de doentes foi dividido em dois grupos, o grupo que desenvolveu retinopatia diabética (N=59) e o grupo que não apresenta retinopatia diabética (N=52). Os dois grupos foram comparados em relação às frequências genótípicas e alélicas. Obteve-se diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos quanto às frequências genótípicas do SNP *CYP2R1*-rs2060793 ( $p=0,02$ ) e a tendência manteve-se para as frequências alélicas embora sem significância estatística ( $p=0,05$ ). Os restantes polimorfismos em estudo não mostraram diferenças significativas para este parâmetro (Tabela 10).

**Tabela 10-** Análise das frequências genótípicas e alélicas consoante a presença ou ausência de retinopatia diabética.

Polimorfismo	Genótipo/ Alelo	Com retinopatia n(%) N=56	Sem retinopatia n(%) N=47	OR	95% CI	Valor de <i>p</i>
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	20 (36)	13 (28)	0,39	0,13 - 1,16	0,08
	TG	30 (54)	23 (49)			
	GG	6 (11)	11 (23)			
	T	70 (62)	49 (52)	0,63	0,35 - 1,14	0,12
	G	42 (38)	45 (48)			
<i>CYP2R1</i> rs2060793	GG	13 (23)	21 (45)	2,70	1,15 - 6,25	0,02
	AG	32 (57)	19 (40)			
	AA	11 (20)	7 (15)			
	G	58 (52)	61 (65)	1,75	0,98 - 3,13	0,05
	A	54 (48)	33 (35)			
<i>CYP24A1</i> rs6013897	TT	32 (58)	26 (58)	3,45	0,37 - 33,3	0,23
	TA	19 (35)	18 (40)			
	AA	4 (7)	1 (2)			
	T	83 (75)	70 (78)	1,15	0,58 - 2,22	0,70
	A	27 (25)	20 (22)			

N número total de indivíduos; n número de indivíduos; OR odds ratio (usando a primeira coluna de genótipos ou alelos como referência); IC intervalo de confiança;

## 4. Discussão e Conclusão

Neste estudo caso-controlo foram estudados três polimorfismos presentes na proximidade ou nos genes responsáveis pela codificação de três enzimas essenciais para a síntese (*DHCR7*-rs12785878), hidroxilação (*CYP2R1*-rs2060793) e catabolismo (*CYP24A1*-rs6013897) da vit D. Os genes escolhidos, apesar de estarem identificados como genes candidatos a associação com os níveis de vit D e conseqüentemente com a DM1, estão pouco explorados pela comunidade científica. Com este estudo pretendemos aprofundar esta possível associação e complementar o estudo já realizado na população portuguesa sobre, a influência de variantes do VDR na DM1 <sup>123</sup>. A escolha dos polimorfismos foi baseada na análise dos estudos de associação genética, onde foram identificados como polimorfismos candidatos a influenciar a susceptibilidade genética para a DM1.

O objectivo deste trabalho foi avaliar de que forma os diferentes génotipos e alelos influenciam a prevalência da DM1 na população portuguesa. De modo a realizar esta análise foram considerados dois grupos principais, o grupo de doentes DM1 e o grupo controlo.

O grupo de doentes foi composto por 320 doentes DM1 portugueses. Neste grupo foram analisados vários parâmetros clínicos com o objectivo de averiguar a existência de relações entre os três polimorfismos em estudo e a patogénese da doença.

O grupo controlo contou com 486 indivíduos portugueses sem historial clínico relacionado com DM1. Esta amostra da população portuguesa não mostrou desvios significativos no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), sendo assim podemos assumir que não ocorreram enviesamentos significativos na nossa população controlo.

Após o recrutamento dos doentes e controlos, os três polimorfismos foram analisados. Os polimorfismos em estudo consistiram de três polimorfismos de nucleótido único (SNP - *single nucleotide polymorphism*), ou seja, resultantes da troca de apenas um nucleótido por outro, numa determinada sequência genómica. Os três SNP's localizam-se em zonas não codificantes dos genes das respectivas enzimas, assim, a sua existência não afecta a estrutura ou a sequência da enzima. No entanto, a presença destes polimorfismos em zonas não codificantes pode causar alterações ao nível da expressão do gene, afectando assim a quantidade de enzima disponível. Alterações no funcionamento das enzimas *DHCR7*, *CYP2R1* e *CYP24A1* podem afectar os níveis de vit D que, por sua vez, se relacionam com a susceptibilidade genética para a DM1.

Numa primeira análise, comparámos a distribuição dos génotipos e alelos entre o grupo de doentes e o grupo de controlos. A distribuição dos génotipos e alelos observada para os SNP's *DHCR7*-rs12785878 e *CYP24A1*-rs6013897 não foi significativamente diferente entre os doentes e controlos. Os estudos do polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897 têm apresentado resultados discrepantes, consoante a população de estudo, sendo necessário a replicação de estudos desta variante de modo a esclarecer os diferentes resultados obtidos. No caso da variante

*DHCR7*-rs12785878 (T>G), está identificada em diferentes populações a sua associação significativa com os níveis de vit D <sup>59,118,124</sup>, sendo o alelo G considerado de risco uma vez que está associado a menores níveis de vit D, aumentando a susceptibilidade genética para a DM1. Esta associação não se verificou para a população portuguesa aqui em estudo, indo ao encontro dos resultados obtidos na população dinamarquesa <sup>120</sup>.

No que diz respeito ao SNP *CYP2R1*-rs2060793 (G>A), este mostrou uma associação estatisticamente significativa com a susceptibilidade genética para a DM1 na população portuguesa. O alelo A é significativamente ( $p=0,03$ ) mais frequente no grupo de doentes, assim como o genótipo AA ( $p=0,02$ ). Da análise realizada concluímos que o genótipo AA, sob o modelo hereditário autossómico recessivo, confere aos seus portadores um risco, aproximadamente, de 1,6 vezes maior (OR 1,61; 95% IC 1,06-2,44) de vir a desenvolver DM1. O efeito desta variante sobre o risco para a DM1 pode estar a ser mediado através de alterações ao nível da taxa de transcrição do gene *CYP2R1*, levando a alterações na via de metabolismo da vit D culminando, possivelmente, em menores níveis de vit D circulantes, por sua vez directamente associados ao aumento do risco para a DM1. Os nossos resultados vão ao encontro dos obtidos na maioria das populações e estudos de associação genética em que esta variante foi analisada <sup>58,60,61,124</sup>, reforçando a hipótese de que a variante em causa influencia a susceptibilidade genética para a DM1. No entanto, nem todos os estudos identificaram tal associação, como é o caso de um estudo dinamarquês <sup>120</sup> e dos resultados obtidos para a população de Pequim <sup>117</sup>. Estes resultados contraditórios podem ser explicados à luz das diferenças étnicas existentes, ou no caso de serem observados entre populações geneticamente semelhantes, podem dever-se à variabilidade dos factores ambientais. Quando aplicado o ajuste do valor de  $p$  para género e idade as diferenças encontradas mantêm-se, mas desaparecem com a aplicação da correcção para comparações múltiplas, a correcção de Bonferroni.

Após a comparação entre doentes e controlos, avaliámos a relação entre os genótipos/alelos dos SNP's em estudo e alguns dos parâmetros clínicos da DM1, de modo a esclarecer se existe algum parâmetro clínico que seja influenciado por estas variantes.

A DM1 manifesta-se caracteristicamente em crianças e jovens e tem vindo a manifestar-se cada vez mais cedo <sup>6</sup>. Sendo que, quanto mais cedo a doença se manifesta mais agressiva e rápida é a sua evolução <sup>21</sup>. Assim, a análise da idade de diagnóstico é um parâmetro de interesse pois a identificação de variantes relacionadas com a idade de diagnóstico seriam óptimos biomarcadores preditivos da evolução da doença. De modo realizar a análise da idade de diagnóstico, o grupo de doentes foi dividido em dois grupos consoante a idade do doente na altura do diagnóstico fosse maior ou menor do que 18 anos, o limite da idade pediátrica. A maioria dos doentes foram diagnosticados com DM1 antes dos 18 anos, como esperado. Não encontramos diferenças significativas entre os dois grupos para os polimorfismos *CYP2R1*-rs2060793 e *CYP24A1*-rs6013897 sugerindo que estas variantes não influenciam a idade de diagnóstico da DM1. Por outro lado, encontramos uma ligeira diferença para o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 (T>G), surpreendentemente o alelo T é significativamente ( $p=0,04$ ) mais

frequente no grupo com idade de diagnóstico inferior ou igual a 18 anos, assim como o genótipo TT. Os resultados obtidos sugerem que a presença deste alelo está associada com a manifestação precoce da doença e por outro lado o alelo G, o menos frequente na população geral, parece ter um efeito protector (OR 0,68; 95% IC 0,45-0,99) contra a manifestação precoce da DM1. Esta associação deixa de ser observada após a correção do nível de significância para comparações múltiplas, no entanto, seria interessante averiguar esta relação numa população de estudo maior com especial interesse na comparação entre crianças DM1 e adultos DM1/LADA (Diabetes Autoimune Latente dos Adultos). De modo a perceber se o SNP *DHCR7*-rs12785878 pode funcionar como biomarcador genético de identificação de doentes diabéticos LADA, evitando o diagnóstico errado de DM2 nestes doentes.

O grupo de doentes foi dividido consoante o género (Masculino vs. Feminino) e as distribuições genóticas e alélicas foram comparadas. De forma geral, a comunidade científica não reporta diferenças significativas na taxa de incidência da DM1 entre homens e mulheres, ao contrário do que acontece para outras doenças autoimunes (tiroidite autoimune, esclerose múltipla, etc.) em que as mulheres apresentam uma maior predisposição para desenvolver a doença do que os homens. No entanto, se os dados forem analisados tendo em conta a idade de diagnóstico, observamos que o diagnóstico de DM1 é duas vezes mais comum em homens do que em mulheres, após os 15 anos de idade <sup>125</sup>, sugerindo que a DM1 se manifesta tendencialmente mais tarde nos homens do que nas mulheres. Da comparação das frequências genóticas e alélicas entre homens e mulheres com DM1 na nossa população, não foram encontradas diferenças para o polimorfismo *CYP2R1*-rs2060793. No caso do polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 (T>G) observamos que o alelo G é mais frequente nos homens do que nas mulheres (p=0,03), assim como o genótipo GG (p=0,04). Sugerindo que homens portadores do alelo G têm um risco (OR 1,43; 95%IC 1,04-1,96) superior de desenvolver DM1 do que as mulheres portadoras deste alelo, indo ao encontro da leve diferença da taxa de incidência da DM1 identificada entre géneros. As diferenças encontradas não se confirmam após o ajuste do valor de p para comparações múltiplas. O mesmo acontece para a diferença significativa (p=0,02) encontrada apenas na distribuição dos genótipos do SNP *CYP24A1*-rs6013897 (T>A), onde o genótipo heterozigótico TA parece aumentar a susceptibilidade para a DM1 nos homens, quando comparado com as mulheres.

O anticorpo anti-GAD65 é o anticorpo mais comum na população de doentes em estudo, e por isso foi realizada a comparação entre os doentes com o anticorpo anti-GAD65 e os doentes sem este anticorpo. Os resultados mostram diferenças significativas apenas para a distribuição dos genótipos referentes ao polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 (T>G). Sendo que, o genótipo heterozigótico TG é significativamente (p=0,005) mais frequente entre os doentes com anti-GAD65, mesmo após a aplicação da correção para comparações múltiplas. Surpreendentemente, ambos os genótipos homozigóticos são mais frequentes nos doentes sem este anticorpo. Esta observação sugere que esta variante em heterozigotia promove o desenvolvimento do anticorpo anti-GAD65 (OR 3,57; 95%IC 1,43 - 9,09). No entanto, para a

correcta interpretação destes resultados, deveríamos ter em conta os genótipos HLA classe II uma vez que além da variabilidade nestes genes contribuir com 50% para a susceptibilidade genética à DM1, o genótipo HLA relaciona-se com o aparecimento dos autoanticorpos <sup>30</sup>.

O valor de peptídeo-C também foi avaliado uma vez que, um valor de peptídeo-C doseável indica a existência de função residual das células B. Ao longo do tempo a função das células B vai decaindo assim como, o valor de peptídeo-C por isso, este é um parâmetro que está directamente associado com a duração e progressão da doença. Por norma, na altura do diagnóstico cerca de 90% das células B estão destruídas associando-se a um valor de peptídeo-C baixo/indoseável. No nosso grupo de doentes observamos que a maioria apresenta valores de peptídeo-C baixos, tal como era esperado. A comparação desse grupo de doentes com os doentes com valores de peptídeo-C normais não mostrou diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que estes polimorfismos não têm um papel relevante na prevenção da destruição das células B, logo, na manutenção dos níveis de peptídeo-C.

Os baixos níveis de vit D têm sido associados com a manifestação de diferentes doenças autoimunes, entre elas a DM1. A identificação do papel da vit D como potente imunomodulador foi o ponto de partida para muitas das associações encontradas. Posteriormente foram identificadas variantes na via de metabolismo da vit D que se mostraram associadas com um risco superior de desenvolver doenças autoimunes específicas. Nesse sentido, os genótipos e alelos dos doentes que além da DM1 manifestavam outra doença autoimune foram comparados com os dos doentes que apenas apresentavam DM1. Os resultados observados não mostram diferenças significativas entre os dois grupos, para nenhum dos três SNP's estudados, sugerindo que estas variantes não estão directamente associadas com o desenvolvimento do processo autoimune. A falta de associação entre o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 e o desenvolvimento do processo autoimune contraria os resultados do estudo DAISY <sup>118</sup> que associaram a presença desta variante com os níveis de vit D e com o aparecimento de autoanticorpos, sugerindo um efeito directo deste SNP no desencadear do processo autoimune da DM1.

A duração da DM1 e a hiperglicemia persistente associada ao mau controlo metabólico do doente, são factores de risco que promovem o desenvolvimento de comorbilidades como a retinopatia diabética, a nefropatia diabética e a neuropatia diabética. Esta última não foi alvo de análise. A presença de retinopatia e nefropatia foram analisadas através da comparação entre os doentes que desenvolveram a comorbilidade e os doentes que não a desenvolveram até à data de colheita da amostra sanguínea. Através desta comparação pretendemos avaliar se existe alguma associação entre algum genótipo/alelo com o risco de desenvolver determinada complicação associada à DM1. Apesar de existirem estudos que relacionam o défice de vit D com a presença de macroalbuminúria em doentes DM1 <sup>126</sup>, a análise da incidência de nefropatia diabética consoante a distribuição dos genótipos/alelos dos polimorfismos em estudo, não mostrou diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos polimorfismos. O resultado obtido sugere que as variantes em estudo não afectam o risco de desenvolver nefropatia diabética. Relativamente à retinopatia diabética,

observámos diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos do SNP *CYP2R1*-rs2060793 (G>A), entre o grupo com retinopatia e o grupo sem retinopatia. Sendo, o genótipo AA significativamente ( $p=0,02$ ) mais frequente nos doentes com retinopatia e por outro lado o genótipo GG mais frequente nos doentes sem retinopatia. O mesmo acontece em relação à distribuição alélica ( $p=0,05$ ), sugerindo que um doente DM1 portador do alelo A tem maior probabilidade (OR 1,75; 95% IC 0,98-3,13) de vir a desenvolver retinopatia diabética, do que portadores do alelo G. A descoberta de que o VDR é amplamente expresso nas células da retina humana despertou a investigação sobre o papel da vit D no desenvolvimento da retinopatia diabética. Estudos em culturas de células e modelos animais, reportam efeitos protectores do calcitriol sobre o desenvolvimento da retinopatia, através da inibição da inflamação e da inibição da proliferação das células endoteliais da retina e da neovascularização <sup>127</sup>. Por outro lado, estudos epidemiológicos observaram que doentes DM1 deficientes em vit D têm uma prevalência de retinopatia diabética significativamente superior à observada em doentes com níveis de vit D normais <sup>128</sup>, mostrando ainda que, o défice de vit D está associado com o aumento da severidade da retinopatia. Ao nível de estudos genéticos, dois dos polimorfismos mais estudados do VDR (FokI e TaqI) mostraram associação com a incidência da retinopatia diabética <sup>129,130</sup>. Posto isto, os nossos resultados sugerem que o SNP *CYP2R1*-rs2060793 também está envolvido na predisposição para a retinopatia diabética, sendo importante a confirmação desta associação através da replicação do estudo em populações diferentes e de maiores dimensões. Nenhuma diferença foi encontrada em relação aos restantes dois polimorfismos.

A principal limitação dos estudos caso-controlo assenta no tamanho da população em estudo e o nosso não é excepção, sendo de extrema importância a confirmação das associações detectadas em novos estudos com populações mais numerosas. Outro parâmetro que seria interessante adicionar às análises realizadas seria os níveis de vit D, através da medição dos níveis de calcidiol (25(OH)D<sub>3</sub>) na altura do diagnóstico da DM1. No entanto, este parâmetro não é relevante do ponto de vista clínico e não é solicitado pelos profissionais de saúde. Alguns dos parâmetros clínicos em estudo, estão directamente associados com a duração da doença (anticorpos, peptídeo-C, retinopatia diabética e nefropatia diabética), factor que não foi tido em conta nas análises estatísticas realizadas.

Concluindo, o nosso estudo sugere que o polimorfismo rs2060793 (G>A) presente no gene da enzima *CYP2R1* está significativamente associado com a taxa de incidência da DM1 na população portuguesa. As nossas descobertas sugerem também que esta variante influencia o desenvolvimento da retinopatia diabética, uma das complicações mais comuns associadas à DM1. Por outro lado, os polimorfismos *DHCR7*-rs12785878 e *CYP24A1*-rs6013897 parecem não afectar a susceptibilidade genética para a DM1 na população portuguesa. No entanto, os resultados obtidos para o polimorfismo *DHCR7*-rs12785878 sugerem a existência de associações com parâmetros clínicos como a idade de diagnóstico, género e sobretudo o aparecimento do anticorpo anti-GAD65. As nossas descobertas reforçam a existência de um papel relevante de polimorfismos presentes nos genes da via de metabolismo da vit D, sobre a

susceptibilidade genética para a DM1, podendo contribuir para a melhor compreensão da patogénese da DM1 e do papel da vit D no desenvolvimento do processo autoimune associado.

## 5. Bibliografia

1. American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes-2017. *Diabetes care* 2017;40.
2. Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SF, Gavin JR, 3rd, Aguilar RB. The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the beta-Cell-Centric Classification Schema. *Diabetes care* 2016;39:179-86.
3. Group DP. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2006;23:857-66.
4. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 2000;355:873-6.
5. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G, Group ES. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009;373:2027-33.
6. Cinek O. Epidemiology of childhood type 1 diabetes mellitus: lessons from Central and Eastern European data. *Hormone research in paediatrics* 2011;76 Suppl 1:52-6.
7. Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G, Soltesz G, Ogle G, Silink M. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 2014;103:161-75.
8. Zhang H, Xia W, Yu Q, et al. Increasing incidence of type 1 diabetes in children aged 0-14 years in Harbin, China (1990-2000). *Primary care diabetes* 2008;2:121-6.
9. Sociedade Portuguesa de Diabetologia; Diabetes "Factos e números" o relatório de 2015 - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes. 2016.
10. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews* 2011;91:79-118.
11. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes care* 2015;38:1964-74.
12. Standards of Medical Care in Diabetes-2017: Summary of Revisions. *Diabetes care* 2017;40:S4-S5.
13. Naik RG, Brooks-Worrell BM, Palmer JP. Latent autoimmune diabetes in adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2009;94:4635-44.
14. Abdul-Rasoul M, H. H, Al-Khouly M. "The honeymoon phase" in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. *Pediatric Diabetes* 2006;7:101-7.
15. Abdul-Rasoul M, Habib H, Al-Khouly M. 'The honeymoon phase' in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. *Pediatr Diabetes* 2006;7:101-7.
16. Mannering SI, Pathiraja V, Kay TW. The case for an autoimmune aetiology of type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology* 2016;183:8-15.
17. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001;414:792-8.
18. Bottazzo GF, Doniach D. Islet-cell antibodies (ICA) in diabetes mellitus (evidence of an autoantigen common to all cells in the islet of Langerhans). *La Ricerca in clinica e in laboratorio* 1978;8:29-38.
19. Lampasona V, Liberati D. Islet Autoantibodies. *Current diabetes reports* 2016;16:53.
20. Eringsmark Regnell S, Lernmark A. The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2013;30:155-60.
21. Knip M, Siljander H, Ilonen J, Simell O, Veijola R. Role of humoral beta-cell autoimmunity in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2016;17 Suppl 22:17-24.
22. Ilonen J, Hammaj A, Laine AP, et al. Patterns of beta-cell autoantibody appearance and genetic associations during the first years of life. *Diabetes* 2013;62:3636-40.
23. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama* 2013;309:2473-9.
24. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, et al. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 2001;44:354-62.

25. Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes and immunity* 2002;3:235-49.
26. Pociot F, Lernmark Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet* 2016;387:2331-9.
27. Nerup J, Platz P, Andersen OO, et al. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 1974;2:864-6.
28. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Current diabetes reports* 2011;11:533-42.
29. Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Molecular aspects of medicine* 2015;42:42-60.
30. Sabbah E, Savola K, Kulmala P, et al. Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes. The Childhood Diabetes In Finland Study Group. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1999;84:1534-9.
31. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes* 2010;59:1561-71.
32. Soderstrom U, Aman J, Hjern A. Being born in Sweden increases the risk for type 1 diabetes - a study of migration of children to Sweden as a natural experiment. *Acta paediatrica* 2012;101:73-7.
33. Raymond NT, Jones JR, Swift PG, et al. Comparative incidence of Type I diabetes in children aged under 15 years from South Asian and White or Other ethnic backgrounds in Leicestershire, UK, 1989 to 1998. *Diabetologia* 2001;44 Suppl 3:B32-6.
34. Knip M, Simell O. Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012;2:a007690.
35. Butalia S, Kaplan GG, Khokhar B, Rabi DM. Environmental Risk Factors and Type 1 Diabetes: Past, Present, and Future. *Canadian journal of diabetes* 2016;40:586-93.
36. Kolb H, Elliott RB. Increasing incidence of IDDM a consequence of improved hygiene? *Diabetologia* 1994;37:729.
37. Tracy S, Drescher KM, Jackson JD, Kim K, Kono K. Enteroviruses, type 1 diabetes and hygiene: a complex relationship. *Reviews in medical virology* 2010;20:106-16.
38. Enan E, Matsumura F. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced changes in glucose transporting activity in guinea pigs, mice, and rats in vivo and in vitro. *Journal of biochemical toxicology* 1994;9:97-106.
39. Langer P, Tajtakova M, Guretzki HJ, et al. High prevalence of anti-glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) antibodies in employees at a polychlorinated biphenyl production factory. *Archives of environmental health* 2002;57:412-5.
40. Fournalanos S, Harrison LC, Colman PG. The accelerator hypothesis and increasing incidence of type 1 diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 2008;15:321-5.
41. Op de Beeck A, Eizirik DL. Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the beta cells? *Nature reviews Endocrinology* 2016;12:263-73.
42. Schulte BM, Bakkers J, Lanke KH, et al. Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetic patients beyond the stage of acute infection. *Viral immunology* 2010;23:99-104.
43. Malcova H, Sumnik Z, Drevinek P, Venhacova J, Lebl J, Cinek O. Absence of breast-feeding is associated with the risk of type 1 diabetes: a case-control study in a population with rapidly increasing incidence. *European journal of pediatrics* 2006;165:114-9.
44. Borch-Johnsen K, Joner G, Mandrup-Poulsen T, et al. Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis. *Lancet* 1984;2:1083-6.
45. Patelarou E, Girvalaki C, Brokalaki H, Patelarou A, Androulaki Z, Vardavas C. Current evidence on the associations of breastfeeding, infant formula, and cow's milk introduction with type 1 diabetes mellitus: a systematic review. *Nutrition reviews* 2012;70:509-19.
46. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 2008;57:2555-62.
47. Wasmuth HE, Kolb H. Cow's milk and immune-mediated diabetes. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2000;59:573-9.
48. Giongo A, Gano KA, Crabb DB, et al. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The ISME journal* 2011;5:82-91.

49. Caprio M, Infante M, Calanchini M, Mammi C, Fabbri A. Vitamin D: not just the bone. Evidence for beneficial pleiotropic extraskeletal effects. *Eating and weight disorders : EWD* 2017;22:27-41.
50. Mathieu C, Badenhop K. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2005;16:261-6.
51. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia* 2008;51:1391-8.
52. Hyponen E. Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes-evidence for an association? *Diabetes, obesity & metabolism* 2010;12:737-43.
53. Jacobsen R, Moldovan M, Vaag AA, Hyponen E, Heitmann BL. Vitamin D fortification and seasonality of birth in type 1 diabetic cases: D-tect study - ERRATUM. *Journal of developmental origins of health and disease* 2016;7:429.
54. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *The Journal of clinical investigation* 1985;76:1536-8.
55. Wassif CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile S, et al. Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *American journal of human genetics* 1998;63:55-62.
56. Casella SJ. A possible genetic defect in 25-hydroxylation as a cause of rickets. *The Journal of pediatrics* 1994.
57. Schlingmann KP, Kaufmann M, Weber S, et al. Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. *The New England journal of medicine* 2011;365:410-21.
58. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010;376:180-8.
59. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, et al. Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes* 2011;60:1624-31.
60. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Human molecular genetics* 2010;19:2739-45.
61. Bu FX, Armas L, Lappe J, et al. Comprehensive association analysis of nine candidate genes with serum 25-hydroxy vitamin D levels among healthy Caucasian subjects. *Human genetics* 2010;128:549-56.
62. Zittermann A, Gummert JF. Nonclassical vitamin D action. *Nutrients* 2010;2:408-25.
63. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews* 2016;96:365-408.
64. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Archives of biochemistry and biophysics* 2000;374:334-8.
65. Maestro B, Davila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2003;84:223-30.
66. Maestro B, Molero S, Bajo S, Davila N, Calle C. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cell biochemistry and function* 2002;20:227-32.
67. Calle C, Maestro B, Garcia-Arencibia M. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC molecular biology* 2008;9:65.
68. Bourlon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *The Journal of endocrinology* 1999;160:87-95.
69. Kadowaki S, Norman AW. Pancreatic vitamin D-dependent calcium binding protein: biochemical properties and response to vitamin D. *Archives of biochemistry and biophysics* 1984;233:228-36.
70. Lehuen A, Diana J, Zaccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature reviews Immunology* 2010;10:501-13.
71. Mauf S, Penna-Martinez M, Jentzsch T, et al. Immunomodulatory effects of 25-hydroxyvitamin D3 on monocytic cell differentiation and influence of vitamin D3 polymorphisms in type 1 diabetes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2015;147:17-23.

72. Szymczak I, Pawliczak R. The Active Metabolite of Vitamin D3 as a Potential Immunomodulator. *Scandinavian journal of immunology* 2016;83:83-91.
73. In't Veld P. Insulinitis in human type 1 diabetes. *Islets* 2014;3:131-8.
74. Acharjee S, Ghosh B, Al-Dhubiab BE, Nair AB. Understanding type 1 diabetes: etiology and models. *Canadian journal of diabetes* 2013;37:269-76.
75. Mathieu C, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 1992;41:1491-5.
76. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2004;47:451-62.
77. Ball SJ, Haynes A, Jacoby P, et al. Spatial and temporal variation in type 1 diabetes incidence in Western Australia from 1991 to 2010: increased risk at higher latitudes and over time. *Health & place* 2014;28:194-204.
78. Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M. Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2009;26:673-8.
79. Svoren BM, Volkening LK, Wood JR, Laffel LM. Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus. *The Journal of pediatrics* 2009;154:132-4.
80. Al-Zubeidi H, Leon-Chi L, Newfield RS. Low vitamin D level in pediatric patients with new onset type 1 diabetes is common, especially if in ketoacidosis. *Pediatr Diabetes* 2016;17:592-8.
81. Pozzilli P, Manfrini S, Crino A, et al. Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2005;37:680-3.
82. Greer RM, Rogers MA, Bowling FG, et al. Australian children and adolescents with type 1 diabetes have low vitamin D levels. *The Medical journal of Australia* 2007;187:59-60.
83. Borkar VV, Devidayal, Verma S, Bhalla AK. Low levels of vitamin D in North Indian children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2010;11:345-50.
84. Azab SF, Saleh SH, Elsaed WF, Abdelsalam SM, Ali AA, Esh AM. Vitamin D status in diabetic Egyptian children and adolescents: a case-control study. *Italian journal of pediatrics* 2013;39:73.
85. Bener A, Alsaied A, Al-Ali M, et al. High prevalence of vitamin D deficiency in type 1 diabetes mellitus and healthy children. *Acta diabetologica* 2009;46:183-9.
86. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, et al. Lower vitamin D status is more common among Saudi adults with diabetes mellitus type 1 than in non-diabetics. *BMC public health* 2014;14:153.
87. Rasoul MA, Al-Mahdi M, Al-Kandari H, Dhaunsi GS, Haider MZ. Low serum vitamin-D status is associated with high prevalence and early onset of type-1 diabetes mellitus in Kuwaiti children. *BMC pediatrics* 2016;16:95.
88. Brody J, Pinhas-Hamiel O, Landau Z, Adar A, Bistrizter T, Rachmiel M. Vitamin D status in Israeli pediatric type 1 diabetes patients: the AWeSoMe Study Group experience and literature review. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 2016.
89. Brekke HK, Ludvigsson J. Vitamin D supplementation and diabetes-related autoimmunity in the ABIS study. *Pediatr Diabetes* 2007;8:11-4.
90. Huynh T, Greer RM, Nyunt O, et al. The association between ketoacidosis and 25(OH)-vitamin D levels at presentation in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2009;10:38-43.
91. Soliman GT. Assessment of Vitamin D Status in Egyptian Children with Type-1 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism* 2015;06.
92. Savastio S, Cadario F, Genoni G, et al. Vitamin D Deficiency and Glycemic Status in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *PloS one* 2016;11:e0162554.
93. Hafez M, Hassan M, Musa N, Abdel Atty S, Azim SA. Vitamin D status in Egyptian children with type 1 diabetes and the role of vitamin D replacement in glycemic control. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 2017;30:389-94.
94. Granfors M, Augustin H, Ludvigsson J, Brekke HK. No association between use of multivitamin supplement containing vitamin D during pregnancy and risk of Type 1 Diabetes in the child. *Pediatr Diabetes* 2016;17:525-30.
95. Takiishi T, Ding L, Baeke F, et al. Dietary supplementation with high doses of regular vitamin D3 safely reduces diabetes incidence in NOD mice when given early and long term. *Diabetes* 2014;63:2026-36.

96. Miller KM, Hart PH, de Klerk NH, Davis EA, Lucas RM. Are low sun exposure and/or vitamin D risk factors for type 1 diabetes? *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2017;16:381-98.
97. Fronczak CM, Baron AE, Chase HP, et al. In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes care* 2003;26:3237-42.
98. Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring. *Diabetologia* 2000;43:1093-8.
99. Gysemans CA, Cardozo AK, Callewaert H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* 2005;146:1956-64.
100. Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Archives of biochemistry and biophysics* 2003;417:77-80.
101. Van Belle TL, Vanherwegen AS, Feyaerts D, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and its analog TX527 promote a stable regulatory T cell phenotype in T cells from type 1 diabetes patients. *PLoS one* 2014;9:e109194.
102. Giarratana N, Penna G, Amuchastegui S, Mariani R, Daniel KC, Adorini L. A Vitamin D Analog Down-Regulates Proinflammatory Chemokine Production by Pancreatic Islets Inhibiting T Cell Recruitment and Type 1 Diabetes Development. *The Journal of Immunology* 2004;173:2280-7.
103. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Archives of disease in childhood* 2008;93:512-7.
104. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin M-R, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *The Lancet* 2001;358:1500-3.
105. Hyppönen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001;358:1500-3.
106. Treiber G, Prietl B, Frohlich-Reiterer E, et al. Cholecalciferol supplementation improves suppressive capacity of regulatory T-cells in young patients with new-onset type 1 diabetes mellitus - A randomized clinical trial. *Clinical immunology* 2015;161:217-24.
107. Mishra A, Dayal D, Sachdeva N, Attri SV. Effect of 6-months' vitamin D supplementation on residual beta cell function in children with type 1 diabetes: a case control interventional study. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 2016;29:395-400.
108. Aljabri KS, Bokhari SA, Khan MJ. Glycemic changes after vitamin D supplementation in patients with type 1 diabetes mellitus and vitamin D deficiency. *Annals of Saudi medicine* 2010;30:454-8.
109. Grammatiki M, Rapti E, Karras S, Ajjan RA, Kotsa K. Vitamin D and diabetes mellitus: Causal or casual association? *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2017;18:227-41.
110. Stene LC, Joner G, Norwegian Childhood Diabetes Study G. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *The American journal of clinical nutrition* 2003;78:1128-34.
111. Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C, Haller M, Schatz D, Atkinson M. Vitamin D levels in subjects with and without type 1 diabetes residing in a solar rich environment. *Diabetes care* 2009;32:1977-9.
112. Gabbay MA, Sato MN, Finazzo C, Duarte AJ, Dib SA. Effect of cholecalciferol as adjunctive therapy with insulin on protective immunologic profile and decline of residual beta-cell function in new-onset type 1 diabetes mellitus. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2012;166:601-7.
113. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature genetics* 2009;41:703-7.
114. Tizaoui K, Kaabachi W, Hamzaoui A, Hamzaoui K. Contribution of VDR polymorphisms to type 1 diabetes susceptibility: Systematic review of case-control studies and meta-analysis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2014;143:240-9.
115. Ramos-Lopez E, Bruck P, Jansen T, Herwig J, Badenhop K. CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2007;23:631-6.

116. Ramos-Lopez E, Bruck P, Jansen T, Pfeilschifter JM, Radeke HH, Badenhop K. CYP2R1-, CYP27B1- and CYP24-mRNA expression in German type 1 diabetes patients. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2007;103:807-10.
117. Zhang Y, Wang X, Liu Y, et al. The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese children. *Swiss medical weekly* 2012;142:w13636.
118. Frederiksen BN, Kroehl M, Fingerlin TE, et al. Association between vitamin D metabolism gene polymorphisms and risk of islet autoimmunity and progression to type 1 diabetes: the diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013;98:E1845-51.
119. Bailey R, Cooper JD, Zeitels L, et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes* 2007;56:2616-21.
120. Thorsen SU, Mortensen HB, Carstensen B, et al. No association between type 1 diabetes and genetic variation in vitamin D metabolism genes: a Danish study. *Pediatr Diabetes* 2014;15:416-21.
121. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 1988;16:1215.
122. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928-9.
123. Lemos MC, Fagulha A, Coutinho E, et al. Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Human immunology* 2008;69:134-8.
124. Zhang Z, He JW, Fu WZ, Zhang CQ, Zhang ZL. An analysis of the association between the vitamin D pathway and serum 25-hydroxyvitamin D levels in a healthy Chinese population. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2013;28:1784-92.
125. Gale EA, Gillespie KM. Diabetes and gender. *Diabetologia* 2001;44:3-15.
126. Engelen L, Schalkwijk CG, Eussen SJ, et al. Low 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 levels are independently associated with macroalbuminuria, but not with retinopathy and macrovascular disease in type 1 diabetes: the EURODIAB prospective complications study. *Cardiovascular diabetology* 2015;14:67.
127. Albert DM, Scheef EA, Wang S, et al. Calcitriol is a potent inhibitor of retinal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007;48:2327-34.
128. Kaur H, Donaghue KC, Chan AK, et al. Vitamin D deficiency is associated with retinopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes care* 2011;34:1400-2.
129. Taverna MJ, Selam JL, Slama G. Association between a protein polymorphism in the start codon of the vitamin D receptor gene and severe diabetic retinopathy in C-peptide-negative type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005;90:4803-8.
130. Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, et al. Taq I polymorphism of the vitamin D receptor and risk of severe diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2002;45:436-42.