

DENISE BARRETTO MORY

**POLIMORFISMOS DO GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA D
NO DIABETES MELITO DO TIPO 1: RELAÇÃO COM A
FUNÇÃO RESIDUAL DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA E
COM A DOENÇA AUTO-IMUNE DA TIRÓIDE**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DENISE BARRETTO MORY

**POLIMORFISMOS DO GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA D
NO DIABETES MELITO DO TIPO 1: RELAÇÃO COM A
FUNÇÃO RESIDUAL DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA E
COM A DOENÇA AUTO-IMUNE DA TIRÓIDE**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Atala Dib

São Paulo

2008

Mory, Denise Barretto

Polimorfismos do gene do receptor da vitamina D no diabetes melito do tipo 1: relação com a função residual da célula beta pancreática e com a doença auto-imune da tiróide / Denise Mory – São Paulo, 2008.

viii, 91 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de pós-graduação em Ciências.

Título em inglês: Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Type 1 diabetes: Relation to beta cell function and autoimmune thyroid disease

1. Gene receptor vitamina D; 2. Diabetes melito tipo 1;
3. Doença autoimune da tiróide.

A Deus,

À minha família,

A todos os pacientes do Centro de Diabetes

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Kenichi e Clara, pelo exemplo de vida, pelo amor, paciência e estímulo pela busca do conhecimento e, principalmente, pela compreensão.

À minha irmã Susana pelo carinho e companheirismo em todas as fases da minha vida.

À minha irmã Patrícia, por sempre estar ao meu lado, pelas dicas, pela revisão das minhas aulas e ao Rodrigo, que ao tornar-se parte dessa família também foi presença constante em todo esse trajeto.

À minha avó Hideko, por sua fortaleza e sabedoria, e por sempre valorizar o conhecimento como o bem mais importante a ser conquistado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Atala Dib, por seu exemplo de médico, pesquisador e orientador a serem seguidos, pelo incentivo e apoio que transformaram um projeto em realidade

À Dra. Mônica Andrade de Lima Gabbay, por estar presente principalmente nos momentos mais difíceis e por tanto ter me ensinado durante esses anos de convívio.

À amiga e colega de pós-graduação Eloá Roberta Rocco e sua mãe, Iolanda Rocco, que tiveram participação fundamental para a realização desse projeto.

À Teresa Kasamatsu, por ter me ensinado os fundamentos da Biologia Molecular e realização dos ensaios de ATPO e, principalmente, por sua amizade e incentivo.

À Walkíria Lopes Miranda, pela realização dos ensaios de Anti-GAD, anti-IA2 e peptídeo-C.

Ao Felipe Crispim, pelo suporte no Laboratório de Endocrinologia Molecular e pela realização das dosagens de TSH.

A Ângela e Ilda, pelo apoio e amizade durante esses anos de pós-graduação e trabalho no Laboratório de Endocrinologia Molecular.

A todos os meus amigos, em especial Ana Paula, Cristhine, Vanessinha, Verônica, entre tantos que me acompanharam, me compreenderam em todos esses anos, torcendo e me incentivando.

A todos os colegas do Laboratório de Endocrinologia Molecular (Beth, Márcio, Maria Regina, Fernando, Janete, Rosana, Gisele, Flávia, Mari, Valter, Rosa Paula, Cléber, Maria Izabel) pela amizade, apoio e ensinamentos nessa área.

Ao amigo e colega de pós-graduação William Komatsu, pela presença e auxílio em várias etapas desse projeto.

Às funcionárias do Centro de Diabetes, Ana, Vera, Célia, Michele e à Paula (nutricionista) pelo apoio durante a realização desse projeto.

À Amarillis Calzano e Ieda, pela paciência e dedicação necessárias e, principalmente, por sua amizade.

À Dra Ieda T.N. Verreschi, que me acompanhou nos meus primeiros passos da vida científica, como orientadora do meu trabalho de iniciação científica na graduação, por seu exemplo de pesquisadora e principalmente por sua amizade.

A todos os professores da Disciplina de Endocrinologia da EPM/Unifesp, que contribuíram com a minha formação médica, especialmente na Residência de Endocrinologia e durante a pós-graduação.

A Erika e Brandon, pela revisão de inglês dos meus artigos científicos.

Aos alunos e professores da EPSG Maria Luisa, com participação fundamental nesse projeto.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Dedicatórias	iii
Agradecimentos	iv
Lista de abreviaturas	vii
Resumo	viii
INTRODUÇÃO	01
Vitamina D	01
Diabetes melito tipo 1, vitamina D e os polimorfismos do RVD	04
Diabetes Melito tipo 1, Doença Auto-imune da Tiróide e os polimorfismos do RVD	13
OBJETIVOS	17
RESULTADOS	18
Artigo 1: Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms <i>FokI</i> and <i>BsmI</i> in Brazilian Type 1 diabetes and their relation to beta cell autoimmunity and to remaining beta cell function	18
Artigo 2: High Frequency of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism <i>FokI</i> in Brazilian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus and Autoimmune Thyroid Disease	23
DISCUSSÃO – Artigo 1	40
DISCUSSÃO – Artigo 2	47
CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	64
ABSTRACT	

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25-dihidroxitaminaD ₃
25(OH)D ₃	25–hidroxivitaminaD ₃
PTH	Hormônio da paratiróide
RVD	Receptor da vitamina D
RXR	Receptor retinóide
ERVD	Elemento de resposta do receptor da vitamina D
DM1	Diabetes Melito tipo 1
DCCT	<i>“Diabetes Control and Complications Trial”</i>
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
Anti-GAD	Anticorpo anti- descarboxilase do ácido glutâmico
Anti-IA2	Anticorpo anti-tirosina fosfatase
ICA	Anticorpo anti-ilhota
<i>Th1</i>	Linfócito T <i>helper</i> tipo 1
<i>Th2</i>	Linfócito T <i>helper</i> tipo 2
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
DAIT	Doença auto-imune da tiróide
ATPO	Anticorpo antiperoxidase

RESUMO

A presença de receptores para a $1\alpha,25$ -dihidroxitaminaD₃ nas células do sistema imune e células beta pancreáticas, entre outros tecidos, tem ampliado os estudos sobre as ações desse hormônio. Esta é a única forma metabolicamente ativa da vitamina D e age através da ativação dos receptores nucleares da vitamina D. Polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (RVD) vêm sendo estudados como marcadores de suscetibilidade genética para o Diabetes Mellito tipo 1 (DM1) e para Doença Auto-imune da tiróide.

Neste estudo, no primeiro artigo, avaliamos a frequência dos polimorfismos do RVD *BsmI* (rs154410) e *FokI* (rs10735810) e sua relação com a função residual das células beta pancreáticas em um grupo de indivíduos com DM1 brasileiros. Não observamos diferenças nas frequências do polimorfismo *FokI* entre os indivíduos com DM1 e grupo controle (C). No entanto, nos indivíduos com DM1 e homozigose ou heterozigose para esse polimorfismo observamos uma tendência à menor função residual da célula beta (5,8% vs. 14,3%, genótipos ff e Ff vs. FF, p=0,07), sem diferenças nas características clínicas e laboratoriais avaliadas. Em relação ao polimorfismo *BsmI* observamos maior frequência de homozigose e heterozigose no grupo C em relação ao DM1 (79,1% vs 66,1%, p= 0,006) e, os indivíduos com DM1 e esse polimorfismo apresentavam idade maior ao diagnóstico (bb e Bb 10,7±4,9 vs. BB 9,3±4,5 anos, p=0,061), sem diferenças na função residual da célula beta.

No segundo artigo, analisamos o polimorfismo do RVD *FokI* nos indivíduos com DM1 e concomitância de Disfunção Tireoidiana (DT). Consideramos como DT hipotireoidismo ou hipertireoidismo. Observamos maior frequência desse polimorfismo nos indivíduos com DM1 e DT (ff e Ff 73,9% com DT vs. 52,7 % sem DT, p= 0,05). Nesses indivíduos observamos também maior frequência de DT no sexo feminino (72% com DT vs. 48,4% sem DT, p =0,02), maior positividade para o ATPO (80% com DT vs. 25% sem DT, p < 0,001) e para o anti-GAD (56% com DT vs. 30,3% sem DT, p= 0,01).

Em resumo, nos indivíduos com DM1 na presença do polimorfismo do RVD *FokI* observamos uma tendência à menor função residual da célula beta pancreática e, na presença do polimorfismo *BsmI* observamos maior idade ao diagnóstico. Essas associações devem contribuir para a heterogeneidade dos resultados encontrada nos estudos que avaliam as relações da vitamina D com o DM1.

Com respeito à associação do DM1 e DT, os dados clínicos e laboratoriais nos indivíduos desta amostra foram semelhantes aos já descritos na literatura. Entretanto, a maior frequência do polimorfismo do RVD *FokI* nos indivíduos com DM1 e DT colabora para a existência de uma possível sobreposição de mecanismos que envolvem a imunidade celular e que assim relacionam a vitamina D com a auto-imunidade presente nessas duas doenças.

INTRODUÇÃO

Vitamina D

Considerações iniciais

A presença de receptores para a $1\alpha,25$ -dihidroxitaminaD₃, nas células do sistema imune e células beta pancreáticas, entre outros tecidos, tem ampliado os estudos sobre as ações desse hormônio além do seu conhecido papel sobre o metabolismo ósseo ^(1,2,3).

A formação da vitamina D₃ inicia-se na pele, através de uma reação fotolítica catalisada pela radiação ultra-violeta. Este processo é sucedido por duas hidroxilações, a primeira no fígado, formando 25-hidroxitaminaD₃ (25(OH)D₃), e a segunda nos rins levando à formação da $1\alpha,25$ -dihidroxitaminaD₃ (1,25(OH)₂D₃), que é o metabólito ativo. A produção da 1,25(OH)₂D₃ nos rins é regulada por vários fatores, particularmente pelo hormônio da paratiróide (PTH) e também por inibição da 1α -hidroxilase. A 1,25(OH)₂D₃ também regula a enzima 24-hidroxilase, responsável por sua degradação ^(1,4,5). Os efeitos clássicos da vitamina D são o aumento da absorção intestinal, reabsorção óssea e renal de cálcio e fosfato, processos fundamentais na homeostase do cálcio ⁽³⁾.

Uma exposição eficiente ao sol (2 horas por semana) é suficiente para manter níveis normais de vitamina D, podendo também ser obtida da dieta através de fontes vegetais (vitamina D₂, conhecida por ergocalciferol) ou animais (vitamina D₃, conhecida por colecalciferol) ⁽¹⁾.

A 1,25(OH)₂D₃ é a única forma metabolicamente ativa da vitamina D e pode ser considerada um hormônio esteróide. Este exerce as suas ações através da ativação dos receptores nucleares da vitamina D (RVD), que são membros da superfamília dos receptores nucleares ^(1,3).

O RVD forma homodímeros ou heterodímeros com os receptores retinóides (RXR), que ligam-se ao elemento de resposta do receptor de vitamina D (ERVD), que correspondem a sequências em genes regulados pela 1,25(OH)₂D₃ ^(3,6). O RVD está ligado a co-repressores no núcleo celular e após a

sua ocupação pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ocorre uma alteração de sua conformação e uma série de eventos que resultam na transcrição gênica. Co-ativadores e fatores de transcrição são necessários para esse processo⁽³⁾. Um resumo das ações genômicas da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estão ilustradas na **figura 1**.

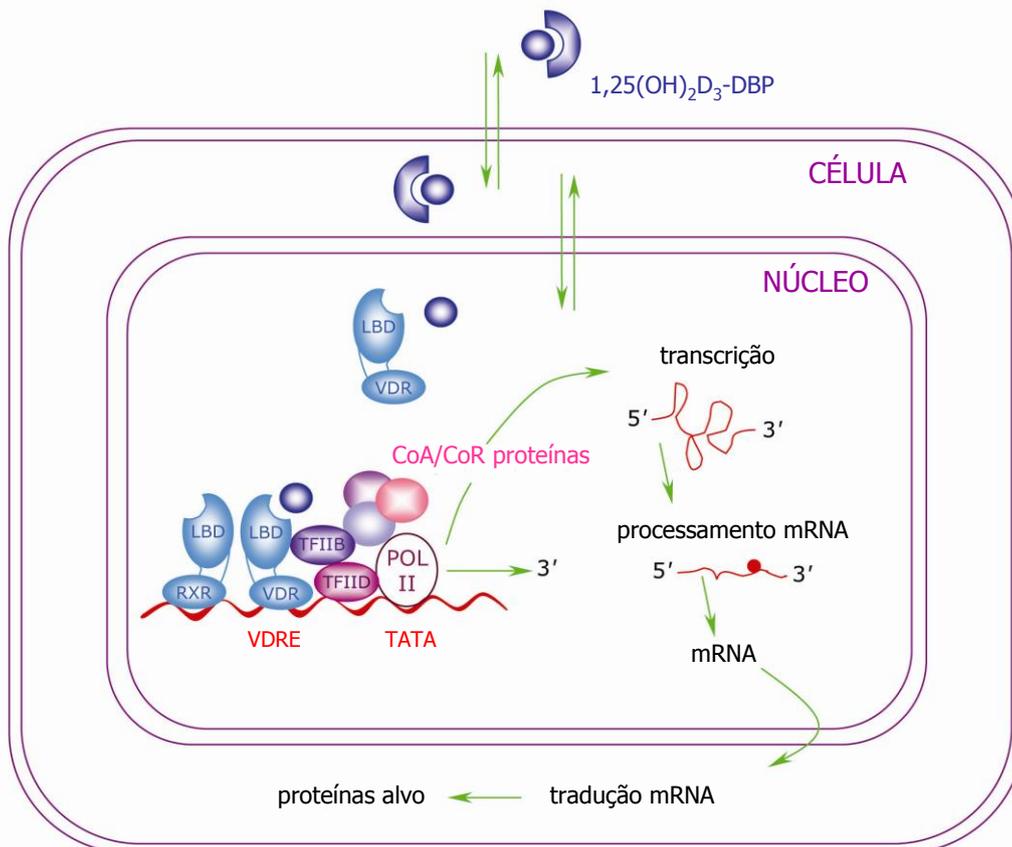


Figura 1: Ações genômicas da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ após ligação ao seu receptor (Adaptado da referência 1). A ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ao receptor da vitamina D (RVD) leva a alterações conformacionais, com heterodimerização com o receptor retinóide (RXR). O complexo RXR-RVD liga-se ao elemento de resposta do RVD (ERVD). Proteínas co-repressoras (CoR) são liberadas da superfície do RVD permitindo a interação com proteínas co-ativadoras (CoA). Ocorre então a interação do receptor com o complexo transcripcional da RNA polimerase II, resultando na transcrição gênica. LBD: domínio de ligação; TF: Fator de Transcrição.

O gene do RVD localiza-se no cromossomo 12, com 75 Kb de DNA genômico. Variações alélicas desse gene têm sido identificadas e estudadas como os polimorfismos *Fok I* no exon 2 (rs10735810), *Bsm I* (rs154410) e *Apa I* (rs7975232), nos introns sucessivos entre o exon 8 e o exon 9, o *Taq I* no exon 9 (rs731236) e *Tru91* no intron 8 (7, 8, 9, **Figura 2**). Além desses polimorfismos que

têm sido extensivamente estudados, outros também foram descritos como P-10858, na região promotora, I3+ 2550 e I3- 3260 no intron 3, rs 1544410 no intron 8 e *Poly A* no exon 9 ⁽¹⁰⁾.

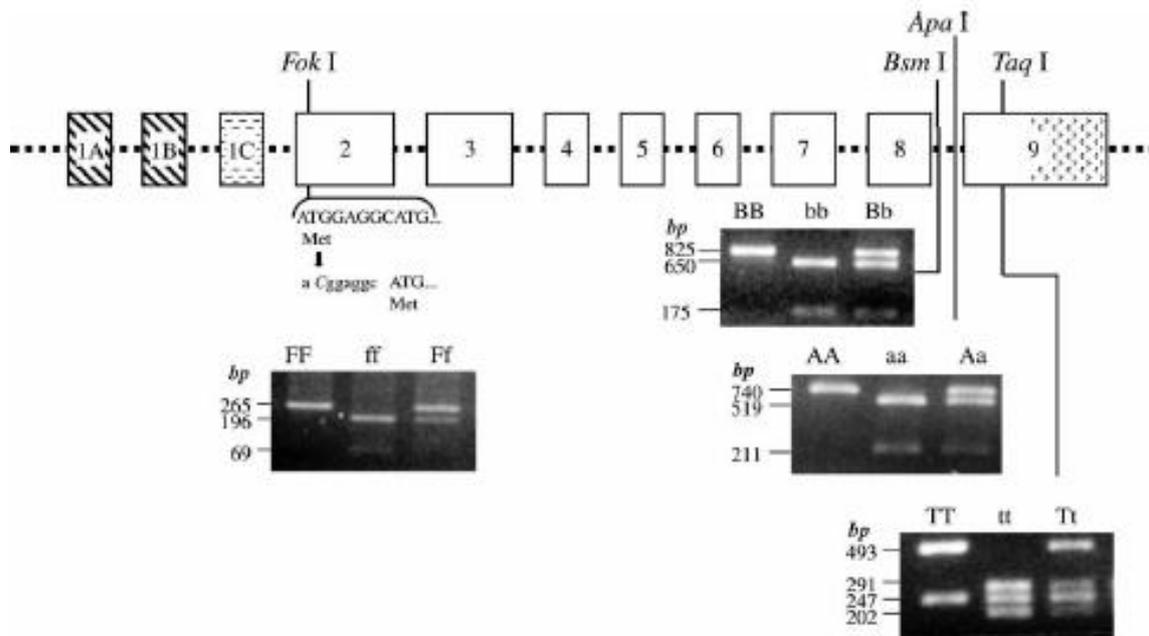


Figura 2: Polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (Adaptado da referência 11). Localização dos sítios de restrição dos polimorfismos: *Fok I* no exon 2, *Bsm I* e *Apa I*, nos introns entre o exon 8 e o exon 9, e *Taq I* no exon 9.

No entanto, somente o polimorfismo *Fok I* resulta em um sítio de início de transcrição alternativo que leva à produção de uma variação da proteína, com adição de 3 aminoácidos na porção aminoterminal ⁽³⁾. Esse polimorfismo afeta a transcrição e resulta em diferenças na modulação do fator de transcrição IIB ⁽¹²⁾.

Estudo *in vitro* com monócitos, células dendríticas e linfócitos com ausência do polimorfismo *FokI* evidenciou uma maior secreção de interleucina-12 e maior proliferação de linfócitos com esse polimorfismo ⁽¹³⁾.

Diabetes melito tipo1, Vitamina D e os Polimorfismos do RVD

A) Diabetes melito tipo 1

O Diabetes melito do tipo 1 (DM1) corresponde ao diabetes associado a uma destruição das células beta pancreáticas resultando em uma deficiência absoluta de insulina. Do ponto de vista etiológico, o DM1 é subdividido em Tipo 1A (DM1A, associado a alterações auto-imunes) e tipo 1B (idiopático) ⁽¹⁴⁾.

O DM1 é uma das doenças mais comuns da infância, com incidência muito variável (superior a 350 vezes) entre populações diferentes. A incidência ajustada pela idade de DM1 varia de 0,1/100000/ano na China e Venezuela a 36,8/100000/ano na Sardenha (Itália) e 36,5/100000/ano na Finlândia ⁽¹⁵⁾. Em São Paulo, SP, Brasil esta é estimada em 7,6/100000 habitantes ⁽¹⁶⁾.

O DM1 apresenta uma predisposição poligênica sobre a qual atuam fatores ambientais ainda não totalmente esclarecidos para o desencadeamento de um processo inflamatório auto-imune, altamente específico, que resulta na destruição das células beta pancreáticas ⁽¹⁷⁾. Este processo é progressivo e se acompanha de uma redução gradativa da secreção de insulina.

Após o diagnóstico clínico as reações auto-imunes contra as células beta prosseguem como também a tendência de evolução para uma insulinopenia absoluta.

O método mais direto para avaliação da função residual das células beta é a medida da secreção endógena de insulina. A avaliação da secreção de insulina através dos seus valores periféricos é limitada devido à insulina sofrer uma grande (40 a 60%) e variável extração na primeira passagem hepática após a sua secreção na veia porta e a um *clearance* oscilante em diferentes condições fisiológicas. Além disso, muitos métodos de dosagem não são capazes de diferenciar a insulina da pró-insulina e de seus intermediários, como também a insulina endógena da exógena ⁽¹⁸⁾.

Do mesmo modo, a terapêutica com insulina induz a produção de anticorpos anti-insulina que podem interferir com alguns ensaios para dosagem da insulina ⁽¹⁸⁾.

A medida do peptídeo-C, contudo, é uma metodologia completamente validada para quantificar a secreção endógena de insulina. Esse peptídeo é co-secretado com a insulina pelas células beta pancreáticas como um subproduto da clivagem enzimática da pró-insulina em insulina. O peptídeo-C e a insulina são secretados na circulação portal em concentrações equimolares. Os parâmetros farmacocinéticos do peptídeo-C são bem estabelecidos e enquanto o fígado metaboliza uma porção significativa da insulina na primeira passagem, o peptídeo-C não sofre essa extração hepática e tem um *clearance* periférico constante em várias concentrações plasmáticas e na presença de alterações nas concentrações de glicemia. O peptídeo-C é excretado exclusivamente pelos rins e a sua meia vida plasmática de aproximadamente 30 minutos contrasta com a curta meia vida da insulina (aproximadamente 4 minutos). Atualmente os ensaios para o peptídeo-C têm sido extensivamente utilizados, sendo a reatividade cruzada com a pró-insulina ou seus produtos de conversão de aproximadamente 10% e, portanto, contribui com uma quantidade desprezível na imunorreatividade total do peptídeo-C. Além disso, estes ensaios apresentam uma baixa variabilidade e alta reprodutibilidade. Por todas essas características, atualmente existe um consenso de que a medida do peptídeo-C é o método mais apropriado no momento para avaliação de secreção residual de insulina no DM1 ⁽¹⁸⁾.

Nos indivíduos com DM1 acompanhados no DCCT (“*Diabetes Control and Complications Trial*”) com duração da doença entre 5 e 15 anos, somente 8% dos adultos e 3% das crianças apresentavam peptídeo-C após estímulo superior a 0,2 pmol/mL (0,6 ng/ml), considerado como função residual da célula beta ⁽¹⁸⁾.

A identificação de fatores prognósticos para a manutenção da função das células beta pancreáticas tem um grande potencial entre os que influenciam na evolução clínica da doença. Apesar da produção endógena de insulina ser insuficiente para manter os valores de glicemia dentro dos parâmetros normais no DM1, uma função residual das células beta facilita o bom controle com pequena ou moderadas doses de insulina exógena. Estudos têm mostrado que mais da metade de jovens adultos com DM1 apresentam peptídeo-C acima do limite inferior de referência, sugerindo uma secreção residual de insulina no momento do diagnóstico clínico. Durante o primeiro ano após o diagnóstico, a

função das células beta permanece estável, mas começa a cair durante o segundo ano⁽¹⁹⁾, de modo que intervenções ou fatores relacionados à manutenção da secreção residual de insulina após esse período são de interesse.

Por último, estudos recentes têm sugerido atividade biológica do peptídeo-C e a sua importância na proteção contra o desenvolvimento das complicações microangiopáticas do diabetes melito⁽²⁰⁾.

Até o momento os estudos mostram que a idade mais avançada ao diagnóstico⁽¹⁹⁾, o controle glicêmico rigoroso⁽²¹⁾, fatores genéticos como os genótipos do HLA⁽²²⁾ e uma variante do gene PTNP22⁽²³⁾ influenciam na manutenção da função residual das células beta. Por outro lado, outros dados mostram que em adultos jovens (15 a 34 anos) os baixos valores de peptídeo-C e elevados de anticorpos anti-GAD ao diagnóstico foram fatores de risco para a diminuição da função das células beta. Entretanto, os valores de outros autoanticorpos (ICA, anti-IA2 ou anti-insulina) ou fatores tais como idade, índice de massa corporal ou gênero não tiveram importância para o prognóstico da evolução da secreção de insulina⁽²⁴⁾.

B) Vitamina D e DM 1

Diversos fatores ambientais vêm sendo estudados como desencadeadores do processo auto-imune do DM1, tais como infecções virais, fatores alimentares e toxinas⁽²⁵⁾.

Entre os fatores alimentares, estudos avaliaram o papel da suplementação da vitamina D e risco de desenvolvimento do DM1. O primeiro estudo, realizado pelo grupo EURODIAB (*“European Community Concerted Action Programme in Diabetes”*), avaliou em 970 indivíduos com DM1 e 3071 controles o uso de vitamina D e o risco de desenvolver DM1, tendo sido observado redução desse risco⁽²⁶⁾. No segundo, a suplementação dessa vitamina no primeiro ano de vida, para a prevenção do raquitismo, foi associada a menor risco de desenvolvimento de DM1, em torno de 80%, nos indivíduos que receberam as doses recomendadas⁽²⁷⁾. Recentemente, um estudo de meta-

análise mostrou que o risco de DM1 foi reduzido de maneira significativa em crianças que receberam suplementação de vitamina D em relação às que não receberam essa vitamina (*odds ratio* 0,71 IC 95%: 0,60 a 0,84). O estudo sugere também um efeito do período e da dose de vitamina D administrada no risco de desenvolvimento do DM1. Entretanto, nas conclusões os autores sugerem que estudos randomizados, controlados, com período de seguimento longo são necessários para estabelecer a relação de causalidade como também a formulação, dose e período de suplementação dessa vitamina adequada para diminuir o risco de DM1 ⁽²⁸⁾.

A exposição à luz solar é a principal fonte de vitamina D, tendo correlação a 25- hidroxivitamina D sérica com a disponibilidade e intensidade da luz ⁽²⁹⁾. Mohr *et al.* ⁽³⁰⁾ estudaram a associação entre a exposição à radiação ultravioleta em 51 regiões do mundo e incidência de DM1, tendo sido observadas maiores taxas de incidência em regiões de maior latitude, em ambos os hemisférios ($r^2 = 0,25$, $p < 0,0001$). Esse estudo, assim como os anteriormente citados, sugere um papel da vitamina D na redução do risco do DM1.

Estudos em modelos animais de DM1 também apontam uma relação entre a reposição de vitamina D e o desenvolvimento de diabetes. Em camundongos NOD (*non obese diabetic*), modelo animal clássico para estudo do diabetes auto-imune, a administração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ preveniu o desenvolvimento do diabetes e da insulite auto-imune ⁽³¹⁾. A deficiência de vitamina D intra-uterina e nas primeiras semanas de vida desses camundongos levou a um início mais precoce do diabetes e a uma apresentação mais agressiva ⁽³²⁾.

Pozzilli *et al.* ⁽³³⁾ e Littorin *et al.* ⁽³⁴⁾ observaram redução nos níveis de vitamina D nos indivíduos com o diagnóstico recente de DM1. Essa redução dos níveis da $25(\text{OH})\text{D}_3$ manteve-se após 8 anos de seguimento, independente da variação sazonal ⁽³⁴⁾. No entanto, a causa dessa redução e se a mesma influencia a história natural da doença não estão estabelecidos.

C) Vitamina D e Auto-imunidade do DM1

Acredita-se que o DM1 decorre de uma alteração no equilíbrio entre as atuações dos linfócitos T *helper* tipo 1 e tipo 2 associado a um redirecionamento da rede de citocinas e que resulta em uma destruição específica das células beta pancreáticas ⁽³⁵⁾.

O reconhecimento de auto-antígenos específicos das células beta pancreáticas por células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T *helper* CD4+ auto-reativos, em associação com moléculas do HLA de classe II, é o primeiro passo para o início da doença. Os macrófagos secretam interleucina-12 (IL-12), que estimula os linfócitos T *helper* 1 (Th1) a secretarem interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2). O IFN- γ estimula a secreção, por macrófagos, de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e radicais livres que são tóxicos para as células beta pancreáticas. As citocinas também promovem a apoptose das células beta diretamente ou por aumento da expressão do receptor Fas na superfície dessas células, tornando-as mais sensíveis à apoptose mediada pelas células T. As citocinas envolvidas na resposta Th1 (IL-2 e IFN- γ) também induzem a ativação e migração de células T citotóxicas CD8+ , aumentando o infiltrado dessas células nas ilhotas ⁽³⁶⁾.

As citocinas da resposta Th2 também podem causar dano as células beta e, em associação com as citocinas Th1, exacerbar o processo inflamatório do DM1 ⁽³⁵⁾. Além disso, a secreção de auto-anticorpos que podem ligar-se a antígenos pancreáticos pode desencadear uma resposta citotóxica dos linfócitos T auto-reativos ⁽³⁶⁾.

Em modelos animais a 1,25(OH)₂D₃ regula a apresentação de antígenos pelas células dendríticas ⁽³⁷⁾ e influencia a secreção de citocinas que determinam o desenvolvimento das células Th1 e inibição das células Th2 ^(38,39), principalmente da IL-12, através da inibição do fator nuclear kappa B ⁽⁴⁰⁾. Estas ações estão esquematizadas na **Figura 3**.

Os efeitos da 1,25(OH)₂D₃ no sistema imunológico são múltiplos, mas todos levam a um estado de tolerância e anergia ao invés de uma ativação imunológica ⁽⁴¹⁾. Na presença da 1,25(OH)₂D₃ células dendríticas se diferenciam

na direção de células com um grau maior de tolerância e expressão menor das moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II e de moléculas de adesão, que são necessárias para uma estimulação completa das células T^(5,42,43). Além disso, como já foi citado acima, as citocinas que possuem uma importância crucial para o recrutamento e ativação das células T são suprimidas pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

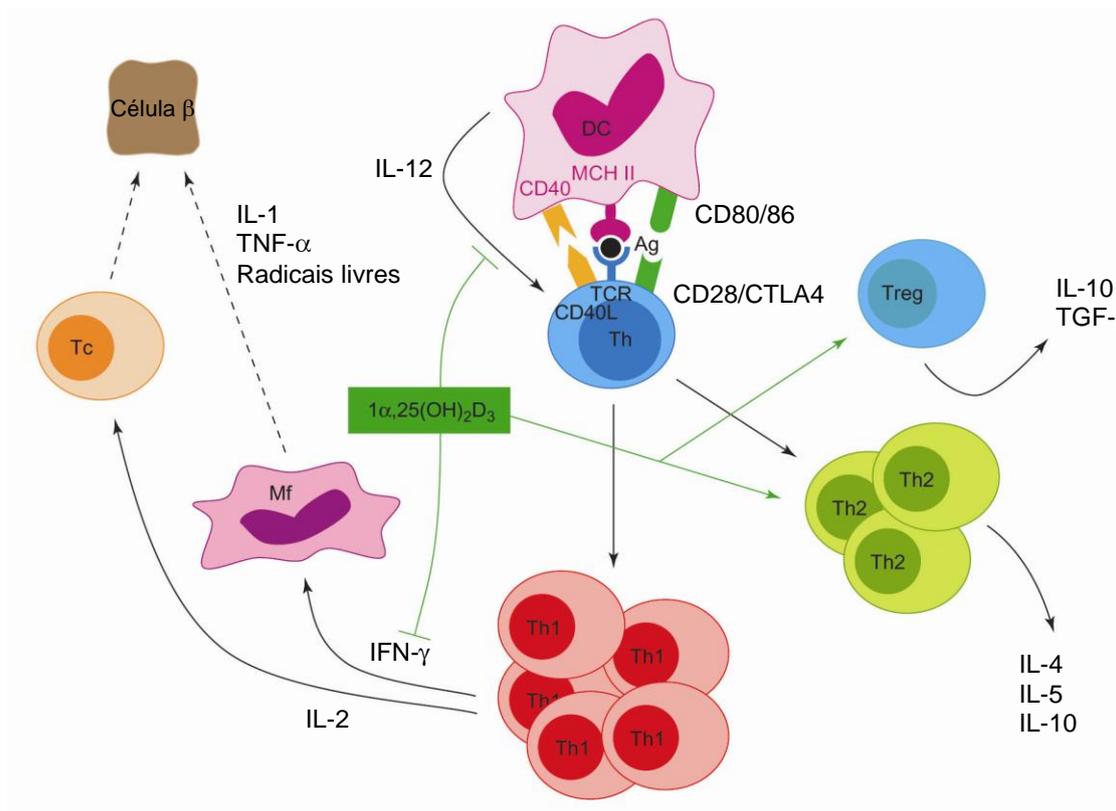


Figura 3: Mecanismos de ação da 1,25 dihidroxivitamina D3 no DM1A (Adaptado da referência 5).

D) Polimorfismos do gene do Receptor da vitamina D e o DM1

Diversos estudos avaliaram até o momento a relação dos polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (RVD) e suscetibilidade genética do DM1, através de comparação de frequências de genótipos ou estudos de transmissão familiar, mas os resultados têm sido heterogêneos.

Na Índia em um estudo que avaliou 93 pacientes com DM1 e suas famílias observou-se uma transmissão preferencial do alelo *b* (ou seja, do alelo com a presença do sítio de restrição) do polimorfismo *BsmI* para os indivíduos afetados ⁽⁴⁴⁾.

Em Taiwan a frequência dos genótipos dos polimorfismos *BsmI* e *Apal* diferiram significativamente entre os indivíduos com DM1 e o grupo controle. O genótipo *BB* (homozigose para ausência do sítio de restrição para o polimorfismo *BsmI*) conferiu maior risco de DM1 (*odds ratio* 6,74 IC 95%:4,54-8,94), assim como o genótipo *AA* (homozigose para ausência do sítio de restrição para o polimorfismo *Apal*) (*odds ratio* 2,46 IC 95%:1,68 -3,24) ⁽⁴⁵⁾.

Na população japonesa dois estudos avaliaram a relação do polimorfismo do RVD *Bsm I* e DM1. No primeiro, foi observada maior frequência do alelo B (alelo com a ausência do sítio de restrição para o polimorfismo *BsmI*) nos indivíduos com DM1 em relação ao grupo controle, tendo sido descrito maior frequência desse mesmo alelo nos indivíduos com início agudo da doença (46). No segundo estudo, também foi observada uma maior frequência do genótipo *BB* (ou seja, homozigose para ausência do sítio de restrição) nos indivíduos com DM1 e, nos indivíduos com esse genótipo foi observado maior produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4 ⁽⁴⁷⁾.

Em relação à presença do polimorfismo *FokI* na população japonesa, esse foi mais frequente nos indivíduos diabéticos e foi associado a positividade para o anticorpo anti-GAD ⁽⁴⁸⁾.

Na Hungria as meninas com os polimorfismos nos sítios *Bsm I*, *Apa I* e *Tru91* apresentaram aumento da chance de DM1, não tendo sido observado o mesmo nos meninos ⁽⁴⁹⁾.

Na Alemanha, foram avaliadas 152 famílias com pelo menos 1 indivíduo com DM1 para detectar as combinações alélicas transmitidas aos afetados, sendo o haplótipo *BAt* (ou seja, ausência dos sítios de restrição para os polimorfismos *BsmI* e *Apal* e presença desse sítio para o polimorfismo *TaqI*, respectivamente) mais associado a suscetibilidade para a doença ⁽⁵⁰⁾.

Em duas populações espanholas, de Barcelona e Navarra, a presença do alelo F (com ausência do sítio de restrição) do polimorfismo *FokI* parece aumentar a suscetibilidade para o DM 1 ⁽⁵¹⁾.

Na Finlândia, país no qual há a maior prevalência de DM1, não foi observada correlação com os polimorfismos do RVD *Apal*, *BsmI* e *FokI* ⁽⁵²⁾.

Na Croácia, a frequência dos genótipos do polimorfismo *FokI* diferiu entre os indivíduos com DM1 e o grupo controle, sendo que a frequência do genótipo ff (ou seja, homozigose para a presença desse polimorfismo) foi maior nos indivíduos com DM1 ⁽⁵³⁾. Em outro estudo nessa mesma região, não foram observadas diferenças nas frequências em relação aos polimorfismos do RVD *BsmI*, *Apal* e *TaqI* entre os indivíduos com DM1 e o grupo controle. No entanto, avaliando-se as frequências combinadas dos genótipos desses polimorfismos, o genótipo *BBAAtt* (homozigose para ausência dos sítios de restrição dos polimorfismos *BsmI* e *Apal* e homozigose para a presença do sítio de restrição *TaqI*, respectivamente) conferiu maior risco para o DM1 (*odds ratio* 4,42 IC 95%:1,72-11,3) ⁽⁵⁴⁾.

Recentemente, os polimorfismos do RVD *FokI*, *BsmI*, *Apal* e *TaqI* foram avaliados em uma amostra de DM1 e controles da população portuguesa. Neste estudo a distribuição das frequências dos genótipos, dos alelos e haplótipos desses polimorfismos não diferiram entre os grupos estudados ⁽⁵⁵⁾.

Os estudos acima citados foram realizados em populações com base genética mais homogênea quando comparadas aos países da América Latina, que se caracterizam por uma grande miscigenação genética.

Em nosso país, o nosso grupo avaliou há alguns anos a prevalência do polimorfismo *BsmI* em indivíduos com DM1 ⁽⁵⁶⁾. Entretanto, naquela ocasião o objetivo foi analisar a correlação entre este polimorfismo e a densidade mineral óssea. A frequência desse polimorfismo nos indivíduos com DM1 e no grupo controle foi semelhante, mas no grupo com DM1 os genótipos *bb* e *Bb* (homozigose e heterozigose para a presença do sítio de restrição para o polimorfismo *BsmI*, respectivamente) associaram-se a maior densidade mineral óssea na coluna lombar.

No Uruguai foram avaliados os polimorfismos do RVD *BsmI*, *FokI* e *TaqI* em 45 indivíduos com DM1 e seus pais. Nessas famílias, observou-se maior frequência do genótipo FFbbTT (homozigose para ausência do sítio de restrição para o polimorfismo *FokI*, homozigose para presença do sítio de restrição para o polimorfismo *BsmI* e homozigose para ausência do sítio de restrição para o polimorfismo *TaqI*) nos indivíduos com DM1 (57). Na população chilena foram estudados os polimorfismos *BsmI*, *ApaI* e *TaqI* em 59 pacientes com DM1 e seus familiares, não tendo sido observado aumento de transmissão dos alelos estudados ⁽⁵⁸⁾.

A diversidade de resultados sugere que a relação entre esses polimorfismos e o DM1 depende da base genética de cada população. Em estudo de meta-análise não foi encontrada associação dos polimorfismos do RVD *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* e *FokI* com DM1 em estudos caso-controle ou de transmissão familiar. Em relação ao polimorfismo *FokI*, dois de cinco estudos com resultados positivos foram realizados em população japonesa. Devido ao tamanho das amostras dos 11 estudos realizados para avaliar esse polimorfismo e, sendo somente 2 estudos em população asiática, não foi possível nessa meta-análise a avaliação de possíveis efeitos étnicos ⁽⁵⁹⁾.

Recentemente, um estudo de meta-regressão avaliou os polimorfismos do RVD *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* e *FokI* levando em consideração a radiação ultra-violeta (UV) do país em estudo. Observou-se um aumento da magnitude do *odds ratio* para associação do alelo F (sem o polimorfismo *FokI*) e DM1 com o aumento da radiação UV (*odds ratio* = 1,1; IC 95%: 1,01 a 1,2, $p = 0,039$). O mesmo foi observado em relação ao polimorfismo *BsmI*, com aumento do *odds ratio* para o alelo B (sem o referido polimorfismo) com o aumento da radiação UV (*odds ratio* = 1,05; IC 95%: 1,00 a 1,10, $p = 0,036$), sugerindo assim que as condições ambientais da radiação UV possam influenciar a associação entre os polimorfismos do RVD e risco de DM1 observada nos diferentes estudos ⁽⁶⁰⁾.

Diabetes melito tipo 1, Doença auto-imune da tiróide e Polimorfismos do RVD

Nos indivíduos com DM1 é frequente o desenvolvimento de outras doenças auto-imunes, como a Doença Auto-imune da Tiróide (DAIT), Doença Celíaca e Doença de Addison. A presença de duas ou mais dessas endocrinopatias, em diferentes combinações no mesmo indivíduo constituem as denominadas Síndromes Poli-glandulares Autoimunes ⁽⁶¹⁾.

A DAIT engloba o hipotiroidismo (Tiroidite de Hashimoto) e o hipertiroidismo (Doença de Graves), sendo o primeiro a endocrinopatia mais frequentemente observada nos indivíduos com DM1 ⁽⁶²⁻⁶⁴⁾.

Nos indivíduos com DM1, a DAIT ocorre com maior frequência nos pacientes de sexo feminino, ocorrendo um aumento na incidência com a idade e com a duração do diabetes ^(62,65). A auto-imunidade tiroidiana, avaliada através dos anticorpos anti-tireoglobulina e anti-peroxidase, pode estar presente desde o diagnóstico do DM1 em torno de um terço dos indivíduos ⁽⁶³⁾ e é um forte preditor do desenvolvimento do hipotiroidismo ⁽⁶⁶⁾.

Assim como observado no DM1, para o desenvolvimento da DAIT acredita-se haver uma suscetibilidade genética associada a um fator desencadeante ambiental levando ao processo auto-imune ⁽⁶⁷⁾ (**figura 4**).

A patogenia do hipotiroidismo assemelha-se à observada no DM1, no qual ocorre uma resposta do linfócito T *helper* tipo 1, com produção de citocinas, recrutamento dos linfócitos T CD8+ resultando em apoptose das células foliculares tiroidianas. No hipertiroidismo predomina uma resposta mediada pelo linfócito T *helper* tipo 2, com a produção de anticorpos estimulantes do receptor do TSH do folículo (TRAb) ⁽⁶⁸⁾.

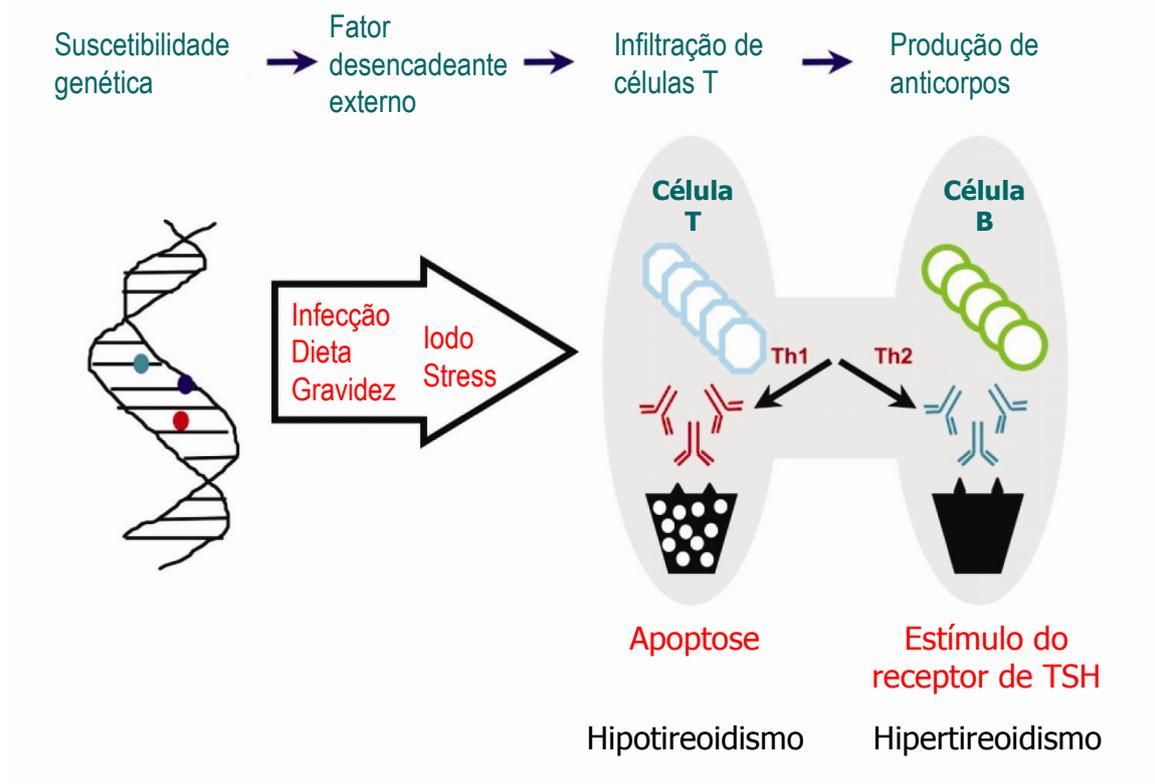


Figura 4: Fisiopatologia do Hipotireoidismo e Hipertireoidismo (Adaptada da referência 67)

Em relação à suscetibilidade genética, alguns estudos apontam associação do HLA-DR3 com Doença de Graves em caucasianos e do HLA-DR4 com Tiroidite de Hashimoto ⁽⁶⁷⁾. No entanto, as mesmas não foram observadas em outros estudos ^(69,70).

Polimorfismos do gene CTLA-4 vêm sendo estudados na suscetibilidade para DAIT. Na população caucasiana estudos descreveram associação de polimorfismos desse gene com Doença de Graves ^(71,72) e com Tiroidite de Hashimoto ^(72,73). Também foi descrita associação da presença do polimorfismo do gene CTLA-4 no exon 1 (49 A/G) com produção de anticorpos anti-tiroidianos em famílias com DAIT ⁽⁷⁴⁾.

O DM1 e DAIT têm sido estudados isoladamente quanto aos fatores genéticos relacionados à suscetibilidade ou proteção. No entanto, na coexistência de ambos parece haver características genéticas distintas ⁽⁷⁵⁾.

Na concomitância de ambas as doenças os estudos em relação ao papel do gene HLA classe II tem resultados diversos (76-80). Na Alemanha, pacientes com DM1 e genótipo do HLA-DR3/DR4 apresentaram uma tendência à maior prevalência de anticorpos anti-tiroidianos ⁽⁷⁶⁾. Em Taiwan, observou-se um aumento da frequência do haplótipo DRB1*0405/DQA1*0301/DQB1*0401 nos pacientes com DM1 e com anticorpos anti-tiroidianos ⁽⁷⁷⁾. No Japão, Chikuba *et al.* ⁽⁷⁸⁾ observaram maior prevalência do HLADR9, DQA1*0301 e DPB1*0501 nos pacientes diabéticos com Doença de Graves, mas o mesmo não foi observado em outro estudo na população japonesa ⁽⁷⁹⁾ e em estudo francês ⁽⁸⁰⁾.

Polimorfismos do gene CTLA-4 também têm sido associados ao DM1 e DAIT. Na população japonesa, o polimorfismo do gene CTLA-4 no exon 1 (49 A/G) associou-se à DAIT em pacientes com menos de 30 anos de idade ao diagnóstico do DM1 ⁽⁸¹⁾. Esse mesmo polimorfismo foi avaliado em indivíduos caucasianos, tendo sido observada associação com Doença de Graves e com DM1 ⁽⁸²⁾. No entanto, no último estudo não foram avaliados indivíduos com as duas doenças concomitantes.

Além dos genes acima citados, alguns estudos avaliaram a relação dos polimorfismos do RVD e DAIT.

Na população japonesa foram avaliadas 130 pacientes do sexo feminino com Tiroidite de Hashimoto em relação aos polimorfismos do RVD *FokI* e *BsmI* tendo sido observada maior frequência do genótipo FF (homozigose para ausência do sítio de restrição) do polimorfismo do RVD *FokI* nos indivíduos com doença tiroídiana ⁽⁸³⁾. O mesmo grupo avaliou os polimorfismos *BsmI* e *Apa I* em 108 pacientes com Doença de Graves tendo sido sugerido que os alelos B (alelo com ausência do sítio de restrição para o polimorfismo *BsmI*) e A (alelo com ausência do sítio de restrição para o polimorfismo *Apa I*) poderiam contribuir para a suscetibilidade genética dessa doença ⁽⁸⁴⁾. Ban *et al.* ⁽⁸⁵⁾ avaliaram 131 pacientes do sexo feminino com Doença de Graves, tendo sido observada maior frequência do genótipo FF (homozigose para ausência do sítio de restrição) do polimorfismo do RVD *Fok I*.

Um estudo avaliou 789 indivíduos caucasianos de 3 países europeus (Alemanha, Polônia e Sérvia) com Doença de Graves em relação aos polimorfismos do RVD *Apal*, *TaqI*, *BsmI* e *FokI*. Não foram observadas diferenças em relação aos polimorfismos *Apal* e *TaqI*. Observou-se associação do alelo b (com presença do sítio de restrição) do polimorfismo *BsmI* com Doença de Graves na população da Polônia. Em relação ao polimorfismo *FokI*, o alelo f (com presença do sítio de restrição) associou-se à Doença de Graves em pacientes da Alemanha e o alelo F (com ausência do sítio de restrição) nos pacientes da Polónia ⁽⁸⁶⁾.

No entanto, no Reino Unido foram avaliados 768 pacientes com Doença de Graves em relação a nove polimorfismos do RVD (*Apal*, *BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *Tru9I*, *PolyA*, P-10858, I3+2550, I3+3260), não tendo sido observada associação com nenhum dos mesmos ⁽¹⁰⁾.

Dessa maneira, os polimorfismos do RVD como marcadores de indivíduos com risco elevado de desenvolver o DM1 e outras doenças auto-imunes permanecem em debate.

Apesar da heterogeneidade dos resultados discutidos acima, os polimorfismos do RVD poderiam estar entre os responsáveis pelo aumento na frequência da associação entre o DM1 e outras doenças auto-imunes. O elo comum seria através do seu envolvimento na resposta auto-imune (75). Os estudos da prevalência desses polimorfismos em indivíduos com ambas patologias seriam interessantes nesse sentido.

Novos esforços visando maior compreensão do papel das variações moleculares e seu papel funcional são necessários, assim como estudos em diferentes populações. Além disso, os efeitos das contribuições dos fatores ambientais em associação com os polimorfismos do RVD permanecem em discussão.

OBJETIVOS

- Avaliar a frequência dos polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (RVD) *BsmI* (rs154410) e *Fok I* (rs 10735810) e a relação com a função residual das células beta pancreáticas em um grupo de indivíduos com Diabetes Mellito tipo 1 brasileiros (artigo 1)
- Analisar o polimorfismo do gene do receptor da vitamina D *Fok I* (rs 10735810) nos indivíduos com DM1 e Doença Auto-Imune da Tiróide (artigo 2)

RESULTADOS

High Frequency of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism *FokI* in Brazilian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus and Autoimmune Thyroid Disease

Denise B. Mory , Eloá R. Rocco, Teresa Kasamatsu, Felipe Crispim,
Walkíria L. Miranda, Sérgio A. Dib.

Endocrinology Division, São Paulo Federal University, Brazil.

Corresponding author:

Sergio A. Dib.

Disciplina de Endocrinologia Escola Paulista de Medicina/ UNIFESP

Rua Botucatu, 740 – CEP: 04034- 970

São Paulo, SP, Brazil.

Phone/Fax: 55 11 5576 4229/ 55 11 5571 9826.

E-mail adress: sergio.dib@unifesp.br

Word Count :Abstract: 347

Main text: 2187

Tables: 1

Figures: 1

Key words: Type 1 diabetes, thyroid autoimmunity, thyroid dysfunction, Vitamin D receptor gene polymorphism

Running title: VDR *FokI* in T1DM with AITD.

ABSTRACT

Background: Type 1 diabetes (T1DM) often presents with other autoimmune diseases, and the most observed is autoimmune thyroid disease (AITD). Associations with immune-modulating genes like HLA class II, CTLA-4 and PTPN22 have been described in genetic basis of both diseases. Polymorphisms of vitamin D receptor gene (VDR) have been studied as genetic markers of T1DM and some studies have also reported associations with AITD. The aim of this study was to analyze the Vitamin D Receptor Gene Polymorphism *FokI* (rs10735810) in Brazilian Type 1 Diabetic Patients with Thyroid Dysfunction. **Methods:** One hundred eighty T1DM were evaluated for age, duration of diabetes (DDM), positivity for TPOAb, GADAb, IA2Ab and fasting C-peptide (FCP) according to diagnosis of thyroid dysfunction (TD). PCR-RFLP analyses were carried out for VDR polymorphism *FokI*. One hundred eighty-seven healthy children and adolescents were also evaluated as control group (C). We considered as Thyroid dysfunction (TD) both hypothyroidism and hyperthyroidism and diagnosis was performed according to TSH levels (TSH > 5.0 mUI/mL and <0.001mUI/mL, respectively). **Results:** TD was more prevalent in female patients with T1DM (72 % vs. 48.4 %, $p=0.028$) and also positivity to TPOAb (80% vs. 25%, $p < 0.001$) and to GADAb (56% vs. 30.3%, $p= 0.012$) with similar age, DDM, IA2Ab and FCP, in relation to the group without TD. In the C group, 7.0% were TPOAb positive and 3.2% had TD. We observed higher prevalence of VDR polymorphism *FokI* in individuals with T1DM and TD (ff and Ff genotypes 73.9% with TD vs. 52.7 % without TD, $p= 0.05$). **Conclusion:** Brazilian T1DM with thyroid dysfunction presented with similar clinical characteristics (higher frequency in female) and autoantibodies profile (higher positivity to TPOAb and GADAb) according to previous studies. However we found in those patients a higher frequency of VDR *FokI* polymorphism. So, the VDR *FokI* polymorphism is associated with thyroid dysfunction in type 1 diabetes in Brazil. In addition, this VDR gene polymorphism may contribute to co occurrence of thyroid autoimmunity and prediction of high- risk group for development of this disease in T1DM.

INTRODUCTION

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) often presents with other autoimmune diseases, and the most frequent observed is autoimmune thyroid disease (AITD) ⁽¹⁻⁴⁾. Recent study ⁽⁵⁾ suggests a genetic basis to concurrence of AITD and T1DM, although further research is still necessary before definitive conclusions can be reached. Each disease is thought to be influenced by multiple susceptibility genes, as well as environmental factors ⁽⁶⁾. Immune-modulating genes like HLA class II region gene, CTLA-4, CD40, PTNP22 and thyroid-specific genes as thyroglobulin, and thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) gene are involved in development of AITD ⁽⁷⁾. Of these, studies showed that HLA and CTLA-4 contribute to susceptibility to both, T1DM and AITD ^(6,8).

Vitamin D has been recognized for its effects on the immune system ⁽⁹⁾ and polymorphisms of vitamin D receptor gene (VDR) have been studied as genetic markers of T1DM ⁽¹⁰⁾. The VDR *FokI* polymorphism in exon 2 leads to an alternative transcription initiation site resulting in a VDR protein with addition of 3 aminoacids ⁽¹¹⁾. A functional role of this VDR polymorphism on the immune response has been previously described. It was observed in vitro that lymphocytes without VDR *FokI* polymorphism proliferated more strongly, with a more active immune response ⁽¹²⁾.

Some studies evaluated the association between VDR polymorphisms and AITD with different results. Japanese studies reported an association between VDR *FokI* polymorphism, Hashimoto's Thyroiditis and Graves' Disease ^(13,14). In German and Polish individuals this polymorphism was associated with Graves' Disease ⁽¹⁵⁾, but the same was not observed in patients from United Kingdom ⁽¹⁶⁾ and Tunisia ⁽¹⁷⁾. In the Croatian population was described an association between VDR polymorphisms haplotypes and Hashimoto's thyroiditis risk ⁽¹⁸⁾.

Approximately 15-30% of patients with T1DM have thyroid autoantibodies, and up to 50% of such patients progress to clinical AITD ⁽¹⁹⁾. Conversely, 2.3% of children with AITD have islet cell antibodies compared with 0% of controls ⁽²⁰⁾.

Despite the well-known association among T1DM, thyroid autoantibodies and clinical AITD, there have been relatively few reports on the shared genetic susceptibility for these three events ^(6,21).

The aim of this study was to evaluate the relationship between the VDR gene polymorphism *Fok I* (rs10735810) in Brazilian individuals with Type 1 diabetes, thyroid autoimmunity and thyroid dysfunction.

SUBJECTS AND METHODS

Study population

We evaluated 180 patients with T1DM according to ADA criteria ⁽²²⁾ attending the Diabetes Center of São Paulo Federal University, SP, Brazil and 187 healthy subjects from an elementary school in the metropolitan area of São Paulo City, SP, Brazil as a control group (C). Both groups have the same ethnic background and have similar socioeconomic status. The study was approved by the Ethics Committee of São Paulo Federal University, Brazil (number 0814/03) and informed consent was obtained from the subjects' parents.

Clinical evaluation

Patients with T1DM were evaluated for age, sex, body mass index (BMI, Kg/m²), age at diagnosis of diabetes, duration of diabetes (DDM) and diagnosis of thyroid dysfunction. In those patients with thyroid dysfunction we also evaluated age at diagnosis and time between development of diabetes and thyroid dysfunction. We considered as thyroid dysfunction both hypothyroidism and hyperthyroidism and diagnosis was performed according to TSH levels. Hypothyroidism was diagnosed if TSH levels > 5.0 mUI/mL and hyperthyroidism if TSH levels were undetectable (< 0.001mUI/mL). All patients with hypothyroidism were taking levothyroxine. Two patients with hyperthyroidism were treated with metimazol with remission of the disease after 1.5 years and 1 year, and another one was still using 30 mg daily of this drug.

We considered presence of thyroid autoimmunity positivity for Thyroid peroxidase antibodies (TPOAb).

METHODS

Fasting blood samples were obtained for laboratory and VDR analyses.

Biochemical Analysis

TSH was measured using a immunofluorimetric assay developed in the Laboratory of Molecular Endocrinology of the Federal University of São Paulo, Brazil (normal range: 0.5-5.0 mUI/mL). Thyroid peroxidase antibodies (TPO Ab) were measured by an immunofluorimetric assay (autoDelfia, Turku, Finland) and we considered the reference value < 52 U/mL for the population studied. GAD65 (GADAb) and Insulinoma antigen-2 (IA2Ab) antibodies were measured by a radioimmunoassay (RSR Ltd, Cardiff,UK) and according to previous study of our group we considered the reference value < 1,72 U/mL and 0,97 U/mL respectively ⁽²³⁾. C-peptide was measured using an immunofluorimetric assay (autoDelfia, Turku, Finland), with detection limit of 0.15 ng/mL. The intra-assay variation was 4.2% (0.52-6.11 ng/mL) and inter-assay variation of 1.1% (0.52ng/mL), 3.4% (6.11ng/mL). HbA_{1c} was measured by HPLC (normal range 3.5 - 6.0%).

Genomic DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes using a commercial kit (PureGene Genome DNA Isolation Kit, Genra Systems, Minneapolis, USA) and amplified by polymerase chain reaction (PCR). The forward primer for *FokI* polymorphism (rs10735810, Genbank accession no AC004466) was 5' AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT3' and the reverse primer was 5' ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC3'. The PCR conditions for the *FokI* polymorphism were 94°C for 5 minutes and 35 cycles using the following profile: 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute and a final extension at 72°C for 10 minutes. It was followed by restriction fragment

length polymorphism according to previous reports for the VDR polymorphism *FokI*^(24,25). Genotypes were determined by 1.8% agarose gel electrophoresis and defined as lower case with the presence of restriction site and capital letters for its absence.

Statistical Analysis

Values are expressed as means \pm SD. Statistical analyses were performed with a SPSS for Windows version 13.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). We used Student's t test, Mann-Whitney test (when variables not normally distributed) and χ^2 tests to compare the demographics, clinical and laboratory characteristics of T1DM group according to presence or absence of Thyroid dysfunction. The same was performed to compare the same characteristics of T1DM and control group. P values \leq 0.05 were considered statistically significant. Hardy-Weinberg equilibrium was calculated to evaluate the gene and genotype frequencies expected and observed.

RESULTS

Screening for thyroid antibodies and function was performed in 187 healthy subjects and in 180 T1DM with different time of clinical diabetes diagnosis.

In the control group (C) 13 of 187 individuals (7.0%) were TPOAb positive and thyroid dysfunction (TD) was observed in 6 (3.2%), all cases of primary hypothyroidism, defined as TSH $>$ 5mUI/L. In T1DM group 58 of 178 patients were TPOAb positive (32.6% vs. 7.0% C, $p <$ 0.001) and TD was observed in 25 patients (13.9% T1DM vs. 3.2% C, $p <$ 0.001). Of these, 22 had primary hypothyroidism and 3 had hyperthyroidism (defined as TSH $<$ 0.001mUI/mL).

The T1DM group with TD had the same age, age at diagnosis of diabetes and DDM of the group without this dysfunction. Also, both groups had

similar residual beta-cell function (Fasting C-peptide) and glycemic control (HbA1c).

Furthermore, the female gender (72.0 vs. 48.4%, $p=0.02$), TPOAb titers (583.3 ± 653.8 vs. 53.4 ± 114.5 U/mL, $p < 0.001$), GADAb titers (15.3 ± 24.5 vs. 7.0 ± 17.0 U/mL, $p= 0.02$), TPOAb positivity (80.0% vs 25.0%, $p < 0.001$) and GADAb positivity (56.0% vs. 30.3%, $p=0.01$) were higher in patients with TD comparing to those patients that did not developed this dysfunction.

Demographic, clinical, laboratory characteristics and prevalence of *FokI* polymorphism are shown according to presence or absence of thyroid dysfunction in table 1.

We did not observe differences in positivity to TPOAb according to *FokI* genotypes in T1DM (35.9% ff and Ff vs. 28.9 % FF genotypes, ns) nor in TPOAb levels (ff and Ff 149.5 ± 367.9 vs FF 95.2 ± 216.5 U/mL, ns).

We observed higher frequency of homozigosis and heterozigosis for the VDR *FokI* polymorphism in T1DM patients with TD in relation to those without (ff plus Ff genotypes 73.9% with TD vs. 52.7% without TD, $p= 0.05$) (**figure 1**). This was still observed when we analyzed T1DM and control groups together (ff plus Ff genotypes 69.0 %with TD vs 50.8% without TD, $p= 0.06$).

VDR polymorphism *FokI* genotypes frequencies were in equilibrium of Hardy-Weinberg in T1DM group.

Table 1: Demographic, clinical, laboratory characteristics and prevalence of VDR *FokI* polymorphism of T1DM patients according to presence or absence of thyroid dysfunction (TD).

	With TD	Without TD	p
n (%)	25 (13.9)	155 (86.1)	
Gender (female%)	72.0	48.4	0.028
Age (years)	16.8 ± 7.1	17.1 ± 5.0	0.286
Age at diagnosis of diabetes (years)	10.0 ± 4.0	10.2 ± 5.1	0.806
TDDM (years)	6.9 ± 6.3	6.9 ± 5.2	0.722
Age at diagnosis of TD (years)	13.8 ± 6.5	-	
BMI (kg/m ²)	21.3 ± 3.2	22.0 ± 3.6	0.186
TSH (mUI/mL)	19.1 ± 59.0	2.2 ± 1.4	0.183
TPO (U/mL)	583.3 ± 653.8	53.4 ± 114.5	< 0.001
TPO Ab positive (%)	80.0	25.0	< 0.001
GAD Ab (U/mL)	15.3 ± 24.5	7.0 ± 17.0	0.016
GAD Ab positive (%)	56.0	30.3	0.012
IA2 Ab (U/mL)	2.1 ± 3.1	3.3 ± 6.5	0.867
IA2 Ab positive (%)	36.0	43.1	0.509
FCP(ng/mL)	0.18 ± 0.29	0.19 ± 0.42	0.770
A1c (%)	9.3 ± 1.6	9.2 ± 1.8	0.753
ff /Ff genotypes(%)	73.9	52.7	0.057

Data are expressed as means ± SD unless otherwise indicated

TDDM: time of duration of diabetes

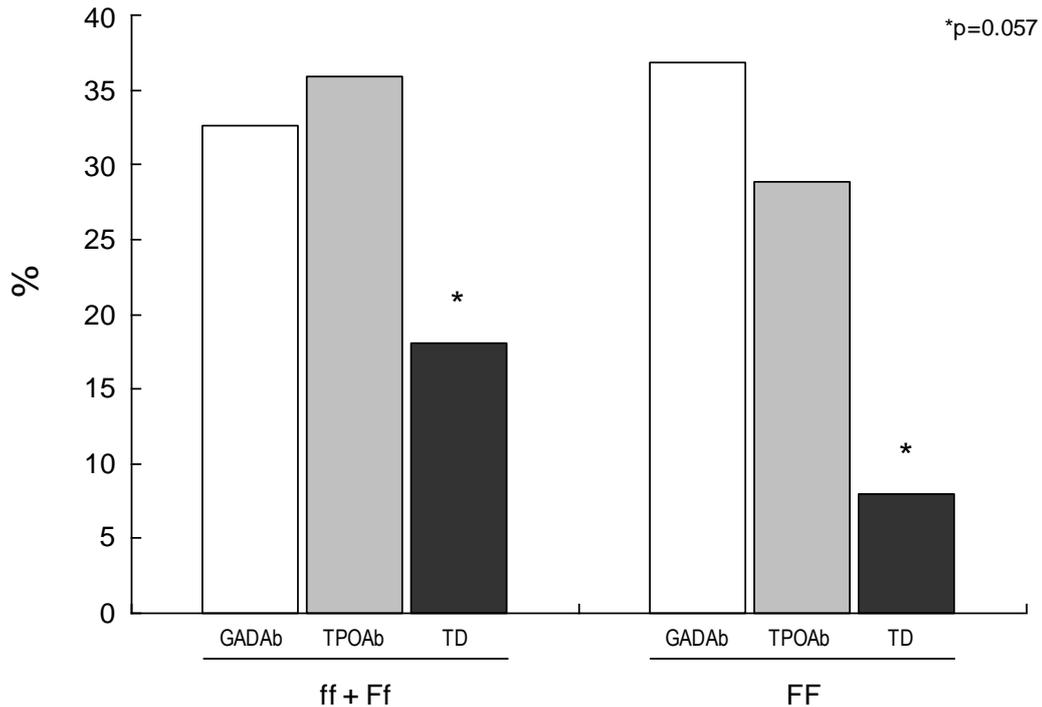


Figure 1: Frequency of positivity to GADAb and to TPOAb and prevalence of Thyroid Dysfunction (TD) according to FokI polymorphism genotypes

DISCUSSION

In the present study we found higher frequency of female gender, higher positivity to TPOAb and GADAb, and higher frequency of VDR *FokI* polymorphism in individuals with T1DM and thyroid dysfunction.

Thyroid dysfunction and positivity to TPOAb was more frequently observed in T1DM than in control group, as previously reported⁽¹⁻⁴⁾ and in agreement with a recently published study of Brazilian T1DM⁽²⁶⁾.

We found thyroid dysfunction in 13.9% of T1DM patients, 12.2 % with hypothyroidism and of these 80 % showed the presence of TPOAb.

Other authors in a prospective study observed a cumulative incidence of autoimmune thyroiditis of 14% in pediatric T1DM patients at 10 years of

diagnosis⁽²⁷⁾, similar to observed in our data, with a mean of 7 years of duration of diabetes. Umpierrez et al.⁽²⁾ evaluated post pubertal individuals from DCCT that have been followed for 18 years and observed 33% of prevalence of thyroid dysfunction, with the mean age of onset of hypothyroidism of 33 y.o. in those individuals with TPOAb positive. This prevalence was higher than the present study besides the similarity of positivity to TPOAb. This difference could be explained by the shorter time of follow-up (mean of 7 years) and by the younger age (mean of 17 y.o) of T1DM patients in our sample, as the presence of TPO antibody is a predictor of development of thyroid dysfunction in T1DM patients⁽²⁸⁾ and this incidence increases with age and time of duration of diabetes⁽²⁷⁾.

Moreover, 72.0% of T1DM patients who developed thyroid dysfunction were female, in accordance with previous studies that have reported an increase of incidence of thyroid dysfunction in female patients^(1,2,27,28) and also, higher prevalence of thyroid autoimmunity^(19,21,26,27).

Studies had described an association between positivity to GADAb and TPOAb in T1DM patients from different populations^(3,29-31). In this study we observed higher prevalence of positivity to GADAb in T1DM individuals with concomitant thyroid dysfunction and TPOAb positive, with similar age and time of duration of diabetes. Despite of this known association, we also observed a positive correlation of the titers of these two antibodies ($r_s = 0.255$, $p < 0.001$).

VDR gene polymorphisms studies in AITD showed controversial results in different populations. In Japanese women with hypothyroidism was reported an increase of *FF* genotype of VDR *FokI* polymorphism⁽¹³⁾ and the same was observed in patients with Graves' disease⁽¹⁴⁾. However, in Caucasians the *f* allele was associated with Graves' disease in Germans and *F* allele in Polish patients⁽¹⁵⁾. This is the first study that evaluated individuals with thyroid dysfunction and T1DM in Brazilian population and we observed that *ff* and *Ff* genotypes were more frequent in those individuals.

Van Etten et al⁽¹²⁾ observed *in vitro* that, besides a more active immune response, monocytes and dendritic cells without *FokI* polymorphism produced

higher levels of IL-12p70 protein after stimulation. In BioBreeding rat, an animal model for AITD and diabetes was observed an imbalance between cytokines secreted by Th1 and Th2 lymphocytes. IL-12m RNA expression was increased in pancreatic islets and also in thyroid gland of those diabetic animals⁽³²⁾. This polymorphism could influence the development of thyroid dysfunction in T1DM individuals through alteration in cytokine secretion.

We observed that 20% of T1DM individuals with thyroid dysfunction did not show TPOAb. The same was previously described by Umpierrez et al.⁽²⁾, in 27% of T1DM individuals with hypothyroidism (20% vs 27%, $p = 0.86$). In pathogenesis of both autoimmune diseases it is known the role of T cells and of cytokines secreted by these lymphocytes^(33,34). In an animal model of autoimmune thyroiditis treatment with IFN- γ and TNF- α enhanced thyroid follicular disruption without increasing titers of auto antibodies against thyroglobulin⁽³⁵⁾. Nevertheless, the absence of TPOAb observed in T1DM individuals with autoimmune thyroid dysfunction may not reflect the absence of the autoimmune process. As we know, although both autoantibodies (TPOAb and Tg Ab) may be complement-fixing and cytotoxic, in Hashimoto's thyroiditis the thyroid gland is infiltrated by both B cells and T cells; the latter are armed with Fas ligand and capable of destroying thyroid cells expressing Fas via apoptosis⁽³⁶⁾. This process is secondary to elaboration of a variety of cytokines from T cells that undergo blast transformation when exposed to thyroid antigens (thyrotropin receptor, TPO, and thyroglobulin), suggesting that cell-mediated autoimmune mechanisms are pathogenetically involved⁽³⁷⁾.

Genetic factors may also be involved in the development of thyroid autoimmunity. It was previously reported a tendency of higher frequency of thyroid antibodies in T1DM patients with HLA DR3/DR4⁽³⁸⁾. Also, a strong correlation between G allele of CTLA-4 gene polymorphism (rs 3087243) with TPOAb was observed⁽²¹⁾. In this study we did not observe differences in TPOAb positivity regarding *FokI* polymorphism genotypes in patients with similar age and duration of diabetes, described as factors related to thyroid autoimmunity^(19,27). Previous studies did not evaluate the relationship between thyroid antibodies and VDR

polymorphisms⁽¹³⁻¹⁸⁾ and further studies in a larger number of individuals are necessary to confirm this finding in T1DM.

In summary, in the present study we observed higher frequency of female gender, positivity to TPOAb and GADAb in individuals with T1DM and thyroid dysfunction. A original finding was a higher frequency of VDR *FokI* polymorphism in those patients.

In conclusion, the VDR *FokI* polymorphism (rs10735810) is associated to thyroid dysfunction in type 1 diabetes in Brazil. Assessment of this VDR gene polymorphism may contribute to prediction of high- risk group for development of thyroid disease and this finding suggests a different role of this VDR polymorphism in humoral and cellular immune response.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Denise B. Mory was supported by a grant by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. Perros P, McCrimmon RJ, Shaw G, Frier BM 1995 Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening. *Diabetic Med* **12**: 622-627.
2. Umpierrez GE, Latif KA, Murphy MB, Lambeth HC, Stentz F, Bush A, Kitabchi AE 2003 Thyroid Dysfunction in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **26**: 1181- 1184.
3. Barker JM, Yu J, Yu L, Wang J, Miao D, Bao F, Hoffenberg E, Nelson JC, Gottlieb PA, Rewers M, Eisenbarth G 2005 Autoantibody “sub-specificity “ in type 1 diabetes: risk for organ specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes Care* **28**: 850-855.
4. Barker J 2006 Type 1 Diabetes-Associated Autoimmunity: Natural History, Genetic Associations, and Screening. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 1210-1217.
5. Awata T, Kawasaki E, Tanaka S, Ikegami H, Maruyama T, Shimada A, Nakanishi K, Kobayashi T, Iizuka H, Uga M, Kawabata Y, Kanazawa Y, Kurihara S, Osaki M, Katayama S on behalf of the Japanese Study Group on Type 1 Diabetes Genetics 2009 Association of Type 1 Diabetes with Two Loci on 12q13 and 16p13 and the Influence Coexisting Thyroid Autoimmunity in Japanese *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 231-235.
6. Levin L, Tomer Y 2003 The etiology of autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common genetic susceptibility. *Autoimm Rev* **2**: 377-386.
7. Jacobson EM, Tomer Y 2007 The Genetic Basis of Thyroid Autoimmunity. *Thyroid* **17**: 949-961.
8. Golden B, Levin L, Ban Y, Concepcion E, Greenberg DA, Tomer Y 2005 Genetic Analysis of families with autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common and unique genes. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 4904-4911.

9. Manolagas SC; Hustmyer FG; Yu, X 1990 Immunomodulating properties of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ *Kidney Int Suppl* **29**: S9-16.
10. Guo S, Magnuson VL, Schiller JJ, Wang X, Ghosh S 2006 Meta-analysis of Vitamin D Receptor polymorphisms and type 1 diabetes: A HuGE Review of Genetic Association Studies. *Am J Epidemiol* **164**: 711-724.
11. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW 1997 Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrinology* **11**: 1165-1179.
12. van Etten E, Verliden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, Overbergh L, Verstuyf A, Bouillon R, Roep BO, Badenhop K, Mathieu C 2007 The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol* **37**: 395-405.
13. Ban Y, Taniyama M, Ban Y. (2001). Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Hashimoto's Thyroiditis. *Thyroid* **11**: 608-608.
14. Ban Y, Ban Y, Taniyama M, Katagiri T 2000 Vitamin D receptor initiation codon polymorphism in Japanese patients with Graves' disease. *Thyroid* **10**: 475-480.
15. Ramos-Lopez E, Kurylowicz A, Bednarczuk T, Paunkovic J, Seidl C, Badenhop K 2005 Vitamin D Receptor Polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. *Thyroid* **15**: 1125- 1130.
16. Collins JE, Heward JM, Nithiyanthan R, Nejentsev S, Todd JA, Franklyn JA, Gough SCL 2004 Lack of association of the vitamin D receptor gene with Graves' disease in UK Caucasians. *Clin Endocrinol (Oxf)* **60**: 618-624.
17. Maalej A, Petit-Teixeira E, Chabchoub G, Bem Hamad M, Rebai A, Farid NR, Cornelis F, Ayadi H 2008 Lack of Association of VDR Gene Polymorphisms with Thyroid Autoimmune Disorders: Familial and Case/ Control Studies. *J Clin Immunol* **28**: 21-25.

18. Stefanic M, Papic S, Suver M, Glavas-Obrovac L, Karner I 2008 Association of vitamin D receptor gene 3`- variants with Hashimoto`s thyroiditis in the Croatian population. *Int J Immunogenet* **35**: 125-131.
19. Kourdonouri O, Klinghammer A, Lang EB, Gruters-Kieslich A, Grabert M, Holl RW 2002 Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **25**: 1346-1350.
20. Bright GM, Blizzard RM, Kaiser DL, Clarke WL 1982 Organ-specific autoantibodies in children common endocrine diseases . *J Pediatr* **100**: 8-14.
21. Howson JMM, Dunger DB, Nutland S, Stevens H, Wicker LS, Todd JA 2007 A type 1 diabetes subgroup with a female bias is characterised by failure in tolerance to thyroid peroxidase at an early age and a strong association with the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene. *Diabetologia* **50**: 741-746.
22. Expert Committe on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003 Report of the expert committe on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26 Supl 1**: S5- 20.
23. Cesarini PR, Mendonça E, Fernandes V, Silva R do C, Morimitsu LK, Garcia FE, Vechiatti S, Miranda WL, Dib SA 2003 Prevalence of immunological markers (Anti-GAD and Anti-IA2) in first-degree relatives of patientes of type 1 diabetes in the greater area of São Paulo. *Rev assoc Med Bras* **49**: 395-400.
24. Chang T-J, Lei H-H; Yeh J-I, Chiu KC, Lee K-C, Chen M-C, Tai T-Y , Chuang L-M 2000 Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol (Oxf)* **52**:575-580.
25. Ban Y, Taniyama T, Yamada S, Maruyama T, Kasuga A, Ban Y 2001 Vitamin D receptor initiation codon polymorphism influences genetic susceptibility to type 1 diabetes in the Japanese Population. *BMC Med Genet* **2**: 7.

26. Araujo J, Brandão LA, Guimarães RL, Santos S, Falcão EA, Milanese M, Segat L, Souza PR, de Lima-Filho JL, Crovella S 2008 Prevalence of Autoimmune Thyroid Disease and Thyroid Dysfunction in Young Brazilian Patients with Type 1 Diabetes. *Pediatr Diabetes* May 7 epub ahead of print.
27. Kordounori O, Hartmann R, Deiss D, Wilms M, Gruters-Kieslich A 2005 Natural course of autoimmune thyroiditis in type 1 diabetes: association to gender, age, diabetes duration and puberty. *Arch Dis Child* **90**: 411-414.
28. González GC, Capel I, Rodríguez- Espinosa J, Mauricio D, De Leiva A, Pérez A 2007 Thyroid Autoimmunity at Onset of Type 1 Diabetes as a Predictor of Thyroid Dysfunction. *Diabetes Care* **30**: 1611- 1612.
29. Fernández- Castañer M, Molina A, López-Jiménez L, Gómez JM, Soler, J 1999 Clinical Presentation and early course of type 1 diabetes in patients with and without thyroid autoimmunity. *Diabetes Care* **22**: 377-381.
30. Rattarasarn C, Diosdado MA, Ortego J, Leelawattana R, Soonthornpun S, Setasuban W, Jaruratanasirikul S, Patarakijvanich N 2000 Thyroid autoantibodies in Thai type 1 diabetic patients: clinical significance and their relationship with glutamic acid decarboxylase antibodies. *Diabetes Res Clin Pract* **49**: 107-111.
31. Bárová H, Perusicová J, Hill M, Sterzl I, Vondra K, Masek Z 2004 Anti-GAD-Positive Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Have Higher Prevalence of Autoimmune Thyroiditis than Anti-GAD-Negative Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes mellitus. *Physiol Res* **53**: 279-286.
32. Zipris D 1996 Evidence that Th1 Lymphocytes Predominate in Islet Inflammation and Thyroiditis in the BioBreeding (BB) rat. *J Autoimmun* **9**: 315-319.
33. Almawi WY, Tamim H, Azar ST 1999 T helper Type 1 and 2 Cytokines Mediate the Onset and Progression of Type I (Insulin-dependent) Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 1497-1502.

34. Weetman AP 2004 Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* **61**: 405-413.
35. Wang SH, Bretz JD, Phelps E, Mezosi E, Arscott PL, Utsugi S, Baker Jr JR 2002 A Unique Combination of Inflammatory Cytokines Enhances Apoptosis of Thyroid Follicular Cells and Transforms Nondestructive to Destructive Thyroiditis in Experimental Autoimmune Thyroiditis. *J Immunol* **168**: 2470- 2474.
36. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A 1997 Potential involvement of FAS and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto`s throiditis. *Science* **275**: 960-963.
37. Doniach D, Botttazo GF, Russell RCG 1979 Goitrous autoimmune thyroiditis. *Clin Endocrinol(Oxf)* **8**:63-80.
38. Holl RW, Bohm B, Loos U, Grabert M, Heinze E, Homoki J 1999 Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. Effect of age, gender and HLA type. *Horm Res* **52**: 113-8.

DISCUSSÃO – ARTIGO 1

Este é o primeiro estudo que avaliou a relação dos polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (RVD) *FokI* e *BsmI* com as características clínicas e a função residual da célula beta pancreática nos indivíduos com DM1 brasileiros. Não observamos diferenças na frequência do polimorfismo de RVD *FokI* entre os indivíduos com DM1 e o grupo controle. Nos indivíduos com DM1 e homozigose ou heterozigose para o polimorfismo do RVD *FokI* houve uma tendência à uma menor função residual da célula beta pancreática, sem diferenças nas características clínicas avaliadas. Em relação ao polimorfismo *BsmI*, observamos menor frequência de homozigose e heterozigose no grupo com DM1 em relação ao grupo controle. No entanto, indivíduos com DM1 com esses últimos genótipos apresentaram idade maior ao diagnóstico, mas sem diferenças na função residual da célula beta.

O DM1 têm incidência variável em diferentes países, sendo muito baixa em países asiáticos e alguns sul-americanos, mas muito alta na Escandinávia ⁽¹⁵⁾. Uma parcela dessas diferenças deve estar relacionada a variações nos marcadores genéticos dessa doença entre essas populações, como o observado em relação ao gene IDDM1, que codifica as moléculas do HLA classe II ⁽⁸⁷⁾.

Em relação aos polimorfismos do RVD, a prevalência encontrada do polimorfismo *FokI* em indivíduos com DM1 no presente estudo foi semelhante à descrita nas populações japonesa ⁽⁸⁸⁾, espanhola ⁽⁵¹⁾ e portuguesa ⁽⁵⁵⁾, mas com diferenças ao observado na Hungria ⁽⁴⁹⁾ e Finlândia ⁽⁵²⁾ (**tabela 1, anexo1**). Esses dados apresentam semelhanças e diferenças ao esperado de acordo com a prevalência do DM1 nesses países, pois a ocorrência dessa doença em nosso país é semelhante à observada na Hungria, na Espanha e em Portugal, mas bem superior à do Japão e inferior à da Finlândia ⁽¹⁵⁾.

No grupo controle estudado observamos diferenças nas frequências dos genótipos encontrados em comparação aos estudos em população japonesa e espanhola (**tabela 1, anexo1**), diferente do observado nos indivíduos com DM1, tendo possivelmente essa população características genéticas semelhantes a

outras populações para o desenvolvimento da doença em relação a esse polimorfismo do RVD. Provavelmente nesse grupo o fator doença pode ter tornado essa população mais homogênea. Isto pode ser reforçado pela grande semelhança entre os nossos achados e o da população controle portuguesa ⁽⁵⁵⁾, ancestrais comuns mais frequentes da população brasileira ⁽⁸⁹⁾.

Tabela 1: Prevalência do polimorfismo do RVD *FokI* nos diferentes estudos

	DM1			Controles			Ref		
	n	FF (%)	Ff (%)	ff (%)	n	FF (%)		Ff (%)	ff (%)
Gyorffy B <i>et al.</i>	107	28,0	55,0	17,0	103	33,0	47,0	20,0	49
Yokota I <i>et al.</i>	108	46,0	43,0	11,0	120	34,2	49,2	16,6	88
Audí L <i>et al.</i>	155	44,5	43,9	11,6	275	38,2	51,6	10,2	51
	86	40,7	52,3	7,0	116	35,3	45,7	19,0	
Turpeinen H <i>et al.</i>	274	27,0	54,7	18,3	808	36,1	51,2	12,7	52
	55	36,3	51,0	12,7	457	37,2	49,5	13,3	
Lemos MC <i>et al.</i>	249	39,3	45,8	14,9	795	43,0	45,3	11,7	55
	207	39,1	48,8	12,1	249	38,9	45,8	15,3	
Mory DB <i>et al.</i>	177	45,8	45,2	9,0	183	49,7	36,7	13,6	

Em relação ao polimorfismo *BsmI*, observamos uma heterogeneidade nas frequências desse polimorfismo nas diferentes populações, como evidenciado na **tabela 2 (anexo1)**. No entanto, na população avaliada, tanto nos indivíduos diabéticos como no grupo controle saudável, as frequências observadas não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados confirmados). Não acreditamos que esse desequilíbrio tenha ocorrido por viés de estratificação, pois o mesmo não foi observado para o polimorfismo *FokI* nos indivíduos com DM1, com as frequências observadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na população do Uruguai foi descrito que as frequências dos genótipos dos

polimorfismos do RVD *FokI* e *BsmI* também não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg⁽⁵⁷⁾. As duas populações têm em comum a miscigenação de negros, caucasianos e indígenas.

Tabela 2: Prevalência do polimorfismo *Bsm I* nos diferentes estudos

	DM1				Controles				Ref
	n	BB (%)	Bb (%)	bb (%)	n	BB (%)	Bb (%)	bb (%)	
Chang TJ <i>et al.</i>	157	2,7	11,0	86,3	248	0,4	6,5	93,1	45
Motohashi I <i>et al.</i>	203	5,9	31,5	62,6	222	0,5	22,0	77,5	46
Audí L <i>et al.</i>	153	14,0	48,0	38,0	274	17,0	54,0	29,0	51
	89	23,0	48,0	29,0	116	16,0	46,0	38,0	
Turpeinen H <i>et al.</i>	220	11,8	44,1	44,1	844	11,7	46,1	42,2	52
	58	12,0	38,0	50,0	1175	13,1	41,5	45,4	
	225	13,8	45,8	40,4	818	13,4	37,3	49,3	
Skrabic V <i>et al.</i>	134	17,9	43,3	38,8	132	12,9	56,1	31,0	54
Lemos MC <i>et al.</i>	207	20,8	46,4	32,8	248	22,6	43,1	34,3	55
Mory DB <i>et al.</i>	177	33,9	32,2	33,9	182	20,9	40,6	38,5	

A importância da função residual das células beta pancreáticas no tratamento, evolução e proteção contra o desenvolvimento das complicações crônicas microangiopáticas do DM1 tem sido avaliada nos últimos anos^(18,20). Entretanto, os fatores que determinam ou colaboram para a manutenção ou prolongamento da secreção residual de insulina no DM1 não estão bem definidos.

Como comentado acima, as células beta pancreáticas possuem RVD⁽³⁾ e estudos têm demonstrado que a secreção de insulina está comprometida na deficiência de vitamina D e pode ser restaurada com a sua administração, como observado em modelos animais⁽⁹⁰⁾. Além do papel do RVD

genômico na secreção de insulina, também tem sido estudado o papel do mesmo receptor localizado na membrana celular ⁽⁹¹⁾.

No entanto, até o nosso conhecimento, os estudos avaliando a relação entre o polimorfismo do RVD e o DM1 referem-se apenas à sua associação com a doença e não com a secreção residual de insulina.

No nosso estudo 9,7% dos pacientes com DM1 avaliados, que tinham um tempo médio de duração da doença igual a 7 anos, apresentavam função residual das células beta pancreáticas considerando o valor de peptídeo-C de jejum maior que 0,6 ng/mL. Este resultado foi semelhante ao encontrado no DCCT, onde valores de peptídeo-C após estímulo maiores que 0,6 ng/mL foram detectados em 8% dos adultos e 3% das crianças com DM1 entre 5 e 15 anos de diagnóstico ⁽¹⁸⁾.

Os principais determinantes descritos relacionados à persistência de uma secreção residual de peptídeo-C no DM1 são a idade de início e o tempo de duração da doença ^(18,19). No nosso estudo, em análise de regressão univariada, o peptídeo-C de jejum correlacionou-se negativamente com a idade, tempo de duração do diabetes e o valor da HbA1c e houve uma correlação positiva com a idade ao início do diabetes. Estas variáveis, com exceção da HbA1c, persistiram significantes com a utilização do modelo de regressão multivariada, o que mostrou uma concordância dos nossos achados com os da literatura ^(18,19).

No entanto, fatores genéticos e sua relação com a função residual das células beta pancreáticas no DM1 têm sido estudados, como o gene HLA classe II e o gene PTNP22. Petrone *et al.* ⁽²²⁾ descreveram menores níveis de peptídeo-C de jejum em indivíduos com DM1 e os genótipos do HLA classe II DRB1-DQB1 de alto risco. O mesmo grupo ⁽²³⁾ avaliou 120 indivíduos com DM1 com diagnóstico recente em relação a variantes do gene PTNP22, função residual da célula beta pancreática, valores de HbA1c e dose diária de insulina. A variante 1858T do gene PTNP22 foi associada à menor função residual da célula beta nos pacientes ao diagnóstico da doença, mantendo-se após 12 meses de seguimento.

Esses indivíduos também apresentaram maiores valores de HbA1c durante o mesmo período, sem diferenças na dose de insulina. Os achados foram independentes da idade ao diagnóstico, sexo e genótipo de risco do HLA.

No nosso estudo, em média após 7 anos do diagnóstico, os indivíduos com DM1 com o polimorfismo do RVD *FokI* em homozigose ou heterozigose (genótipos ff e Ff) apresentaram uma tendência a menor função residual da célula beta pancreática, avaliada através de dosagem dos níveis de peptídeo-C de jejum.

Somente dois estudos em modelos animais avaliaram a relação do RVD e desenvolvimento de diabetes, tendo sido avaliados animais sem esse receptor funcionante. No primeiro, os camundongos com o RVD mutante e inativo apresentaram maiores valores de glicemia após sobrecarga de glicose e menor secreção de insulina, sem alterações estruturais da ilhota pancreática⁽⁹²⁾. No outro estudo, os camundongos *NOD* (*non obese diabetic*) sem o RVD apresentaram alterações na resposta imunológica importantes para o desenvolvimento do diabetes mas, paradoxalmente, sem alteração no tempo de aparecimento do diabetes ou gravidade da insulite e também sem alterações da arquitetura da ilhota pancreática⁽⁹³⁾.

Em relação ao polimorfismo do RVD *FokI*, como já comentado anteriormente, estudos *in vitro* de linfócitos com genótipo FF (sem a presença do referido polimorfismo) apresentaram maior proliferação em resposta ao estímulo antigênico. Nesse estudo monócitos e células dendríticas com o mesmo genótipo também expressaram maiores níveis de RNA mensageiro da IL-12⁽¹³⁾. No DM1, essa interleucina é o principal determinante da resposta T *helper* tipo 1, que resulta na destruição das células beta⁽³⁶⁾.

A menor função residual observada poderia ser decorrente de uma maior destruição das células beta pelo processo auto-imune. Como é do conhecimento geral os anticorpos contra a célula beta são considerados marcadores da presença desse processo⁽⁹⁴⁾. Estudos da literatura têm mostrado

que valores elevados do anti-GAD podem estar associados a menores níveis de peptídeo-C ao diagnóstico e durante o seguimento em um grupo de pacientes com DM1⁽²⁴⁾, o mesmo ocorrendo em relação à presença do anticorpo IA-2⁽⁹⁵⁾. No nosso estudo não observamos diferenças nas frequências de positividade para os anticorpos anti-GAD e anti-IA2 em relação aos genótipos do RVD. Somente um estudo na população japonesa observou correlação entre esse polimorfismo e a presença dos anticorpos anti-GAD⁽⁴⁸⁾. No entanto, estudo *in vitro* demonstrou que esse polimorfismo poderia estar relacionado à produção de determinadas citocinas⁽¹³⁾ mais relacionadas à imunidade celular. De modo que poderia justificar essa heterogeneidade da relação entre presença do polimorfismo do RVD com os autoanticorpos anti-células beta circulantes.

Por outro lado, sabe-se que a secreção de insulina é um processo cálcio dependente⁽⁹⁶⁾ e nós encontramos nos indivíduos com DM1 níveis menores de cálcio ionizado em relação ao grupo controle, porém ainda dentro da faixa de normalidade. No entanto, na análise intra-grupo não observamos diferenças nos valores da calcemia entre os indivíduos com DM1 segundo os genótipos do RVD. Sendo assim, as alterações nos valores desse cátion não seriam suficientes para explicar as diferenças na secreção de insulina encontradas nos pacientes DM1 com e sem os polimorfismos do RVD.

As diferenças nos níveis de cálcio entre os indivíduos com DM1 e os controles podem ser justificadas pelas alterações no controle glicêmico, resultando em glicosúria e calciúria⁽⁹⁷⁾ e também por uma menor reposta do PTH observada nos indivíduos com DM1⁽⁹⁸⁾.

Ainda nesse sentido, a deficiência de vitamina D reduz a secreção de insulina em indivíduos saudáveis⁽⁹⁹⁾ e em indivíduos de risco de desenvolvimento de Diabetes melito tipo 2⁽¹⁰⁰⁾. No Brasil, apesar do clima tropical, estudos em idosos indicaram deficiência de vitamina D semelhante à observada em países com inverno prolongado^(101,102). Em estudo que avaliou a concentração da 25 hidroxivitamina D₃ em adultos jovens na cidade de São Paulo foram observados valores semelhantes aos países do hemisfério norte⁽¹⁰³⁾. Nos

indivíduos com DM1 recém-diagnosticados foi descrito redução desses níveis^(33,34) com a persistência desses níveis menores mesmo após 8 anos de doença⁽³⁴⁾. Não há estudos de deficiência de vitamina D em crianças e adolescentes em nossa população, sendo uma das limitações do presente estudo não termos realizado a dosagem dessa vitamina. Dessa maneira, não podemos afirmar se os níveis de vitamina D possam ter influenciado nossos resultados.

Com relação ao polimorfismo do RVD *BsmI* no Brasil, apenas um estudo do nosso grupo avaliou a prevalência desse polimorfismo em indivíduos com DM1, não tendo sido observada diferença na prevalência do mesmo entre os indivíduos com DM1 e controles saudáveis. No entanto, este estudo tinha como objetivo avaliar a correlação entre este polimorfismo e a densidade mineral óssea⁽⁵⁶⁾. Avaliamos um número maior de indivíduos, tendo sido observada maior frequência de indivíduos com DM1 sem o referido polimorfismo em comparação ao grupo controle (Genótipo BB 33,9% DM1 vs 20,9% grupo controle, $p=0,006$).

Os indivíduos com DM1 e o genótipo BB (sem o referido polimorfismo) apresentavam menor idade ao diagnóstico (Genótipos BB $9,3 \pm 4,5$ anos vs. bb e Bb $10,7 \pm 4,9$ anos, $p = 0,061$) e menores níveis de peptídeo-C de jejum (Genótipos BB $0,12 \pm 0,24$ ng/mL vs. bb e Bb $0,22 \pm 0,46$ ng/mL, $p = 0,07$, dados não mostrados) no momento do estudo. O início mais precoce do DM1 nos indivíduos sem esse polimorfismo são um dos dados originais desse estudo. Os fatores relacionados à idade de início do DM1 são múltiplos, no entanto, um estudo na população japonesa onde a maior frequência do genótipo BB (sem o referido polimorfismo) nos indivíduos com DM1 estava relacionada a uma maior secreção de interferon- γ pelos linfócitos T CD4, sugere um papel para esse polimorfismo na resposta Th1⁽⁴⁷⁾ e, poderia colaborar para esses achados no nosso estudo.

DISCUSSÃO – ARTIGO 2

O presente estudo mostrou que os indivíduos com DM1 e disfunção tireoidiana (DT) apresentaram maior frequência do sexo feminino, positividade para os anticorpos anti-GAD e anti-peroxidase tireoidiana e frequência do polimorfismo do RVD *FokI* comparados aos seus pares eutiroidianos.

Estes achados relacionados à DT e positividade para o anticorpo anti-peroxidase nos indivíduos com DM1 em relação ao grupo controle estão em concordância com os relatos em outras populações ^(62,63,64,104) e também com um estudo em nosso país ⁽¹⁰⁵⁾.

Dos pacientes com DM1 avaliados, 13,8% apresentavam DT, sendo 12,2% com diagnóstico de hipotireoidismo e desses, 80% apresentavam positividade para o anticorpo anti-peroxidase (ATPO). Em estudo prospectivo que tinha como objetivo avaliar a história natural da Tireoidite auto-imune e sua incidência em pacientes pediátricos com DM1, a incidência cumulativa observada de hipotireoidismo foi de 14% após 10 anos do diagnóstico de DM1 ⁽⁶⁵⁾, semelhante ao encontrado no presente estudo, em um grupo com média de 7 anos de diagnóstico. Umpierrez *et al.* ⁽⁶³⁾ acompanhou 58 pacientes que faziam parte do grupo do DCCT por 18 anos e observou 33% de prevalência de hipotireoidismo, maior que a observada nesse estudo, com idade média de início de 33 anos nos indivíduos com ATPO positivo. No entanto, a prevalência de positividade para o ATPO foi semelhante. Provavelmente a diferença na frequência observada é secundária ao menor tempo de seguimento (média de 7 anos) e idade menor (média de 17 anos) dos pacientes no presente estudo, pois ambos são fatores relacionados ao aumento da incidência de DAIT ^(65,106).

Observamos nos pacientes com até 6 meses de diagnóstico de DM1 31,3% de positividade para o ATPO (dados não mostrados), semelhante ao previamente descrito na literatura ⁽⁶⁶⁾. Outro estudo avaliou a positividade para os anticorpos anti-tiroidianos em 7097 pacientes pediátricos com DM1A da Alemanha e Áustria, tendo sido observado um aumento da prevalência desses

anticorpos nos diferentes grupos etários, com maior prevalência no grupo de 15 a 20 anos⁽¹⁰⁷⁾. No presente estudo não observamos esse aumento (dados não mostrados), ressaltando que foram avaliados somente 11 indivíduos com até 10 anos de idade.

Dos pacientes com DM1 e DT 72% eram do sexo feminino, assim como observamos maior frequência de positividade para o ATPO (44,6% sexo feminino vs. 19,8% sexo masculino, $p < 0.001$), como previamente descrito na literatura^(62,63,65,66,105,107,108).

Nos indivíduos com DM1 já é de conhecimento geral a autoimunidade contra órgãos específicos. Em estudo que avaliou 814 indivíduos com DM1 observou-se que pacientes com anticorpos anti-GAD apresentaram maior frequência de anticorpos anti-tiroidianos do que aqueles com anti-GAD negativo (35% vs. 24%, $p = 0.0008$)⁽¹⁰⁴⁾. Outros estudos em diferentes populações também descreveram essa mesma associação⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾. Observamos maior frequência de positividade para o anticorpo anti-GAD, nos indivíduos com DM1, DT e com ATPO positivo, sem diferenças na idade e tempo de duração do diabetes. No entanto, em estudos anteriores somente foi avaliada a positividade para os anticorpos anti-GAD e ATPO e, observamos também que os títulos dos mesmos estavam significativamente relacionados ($r_s = 0,255$, $p < 0,001$). Não existem dados consistentes na literatura com relação à correlação dos títulos desses dois anticorpos.

A relação entre a presença dos polimorfismos do RVD e a DAIT foi avaliada em diferentes populações com resultados heterogêneos, como comentado previamente^(10,83-86). No entanto, esse é o primeiro estudo que avaliou indivíduos brasileiros com concomitância de DM1 e DAIT.

O DM1 e a DAIT são doenças auto-imunes com predominância da resposta do linfócito T *helper* tipo 1^(35,68). Em modelo animal, foi observado um desequilíbrio na secreção de citocinas pelos linfócitos T *helper* tipos 1 e 2, com maior expressão de RNA mensageiro da IL-12 nas ilhotas pancreáticas e na

tiróide dos animais que desenvolveram diabetes ⁽¹¹²⁾. Estudo *in vitro* evidenciou uma maior secreção de IL-12 e maior proliferação de linfócitos com ausência do polimorfismo *FokI* ⁽¹³⁾. Dessa maneira, esse polimorfismo pode colaborar para o desenvolvimento de uma resposta imunológica nessa direção.

Outros fatores genéticos podem estar envolvidos no desenvolvimento da auto-imunidade tiroídiana, como já descrito em pacientes com DM1 com genótipo do HLA DR3/DR4, que apresentaram uma tendência à maior prevalência de auto-anticorpos tiroídianos ⁽⁷⁶⁾. Recentemente, foram avaliados polimorfismos dos genes CTLA-4, PTNP22, HLA classe II e gene da insulina tendo sido observada uma forte associação do polimorfismo do gene CTLA-4 (rs3087243) com a presença do anticorpo ATPO ⁽¹⁰⁸⁾. Contudo, no presente estudo não observamos diferenças na positividade para o ATPO em relação aos genótipos do polimorfismo *FokI*, em pacientes com idade e tempo de duração de diabetes semelhantes, fatores conhecidamente relacionados à auto-imunidade tiroídiana ^(65,107). Em estudos anteriores da relação entre DAIT e RVD ^(10,83-86) não foi avaliada essa associação com a auto-imunidade.

CONCLUSÕES

Conclusões – Artigo 1

A frequência observada do polimorfismo do RVD *FokI* foi semelhante entre os indivíduos com DM1 e o grupo controle saudável. Nos indivíduos com DM1 observamos uma tendência a uma menor função residual da célula beta pancreática na presença desse polimorfismo.

Em relação ao polimorfismo do RVD *BsmI*, observamos menor frequência de homozigose e heterozigose no grupo com DM1. Os indivíduos com DM1 e esse polimorfismo apresentaram maior idade ao diagnóstico e maiores níveis de peptídeo-C de jejum. No entanto, o achado do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg observado para o esse polimorfismo propõe que essa conclusão seja interpretada com cautela.

Estudos em diferentes populações para avaliar as relações descritas são necessários para elucidar o papel dos polimorfismos do RVD na genética do DM1, sua relação com a função da célula beta e com idade ao diagnóstico da doença.

Conclusões – Artigo 2

Os indivíduos com DM1 e Disfunção Tiroídiana avaliados apresentavam características clínicas (sexo feminino) e laboratoriais (positividade para os auto-anticorpos anti-peroxidase e anti-GAD) semelhantes às descritas na literatura.

Observamos relação entre o polimorfismo de RVD *FokI* e presença de disfunção tiroídiana, sem diferenças na prevalência de positividade ou títulos dos anticorpos anti-peroxidase e anti-GAD, sugerindo mecanismos diferentes nas respostas imunes humoral e celular.

REFERÊNCIAS

1. Mathieu C, Gysemans C, Giuliatti A, Bouillon R (2005). Vitamin D and Diabetes. *Diabetologia* 48: 1247-1257.
2. Holick M.F (2003). Vitamin D: a millenium perspective. *J Cell Biochem* 88: 296-307.
3. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh J-C, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW (1998). The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. *J Bone Miner Res* 13: 325-349.
4. Dusso AS, Brown AJ (1998). Mechanisms of vitamin D action and Its regulation. *Am J Kidney Dis* 32 Suppl 2:S13-S24.
5. Mathieu C, Badenhoop K (2005). Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of art. *Trends Endocrinol Metab* 16: 261-266.
6. Kato S (2000). The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *J. Biochem.* 127: 717-722.
7. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE (2000). Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants . *Epidemiol Rev* 22(2):203-217.
8. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, Pols HAP, van Leeuwen JPTM (2004). Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338: 143- 156.
9. Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, Howson JMM, Rance H, Nutland S, Walker NM, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Undlien DE, Ronningen KS, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Gillespie KM, Ring SM, Strachan DP, Widmer B, Dunger D, Todd JA (2004). Analysis of the Vitamin D Receptor Gene Sequence Variants in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53: 2709-2712.
10. Collins JE, Heward JM, Nithiyanthan R, Nejentsev S, Todd JA, Franklyn JA, Gough SCL. (2004). Lack of association of the vitamin D receptor gene with Graves' disease in UK Caucasians. *Clin Endocrinol* 60: 618-624.

11. San-Pedro JI, Bilbao JR, Peres de Nanclares G, Vitoria JC, Martul P, Castano L (2005). Heterogeneity of vitamin D receptor gene association with celiac disease and type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity* 38:439-444.
12. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh J-C, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HTL, Haussler CA, Haussler MR (2000). The Polymorphic N terminus in human vitamin D Receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* 14: 401-420.
13. van Etten E, Verliden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, Overbergh L, Verstuyf A, Bouillon R, Roep BO, Badenhoop K, Mathieu C (2007). The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol* 37: 395-405.
14. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Supl 1: S5- 20.
15. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J, for the Diabetes Mondiale (DIAMOND) Project Group (2000). Incidence of Childhood Type 1 Diabetes Worldwide. *Diabetes Care* 23: 1516-1526.
16. Ferreira SR, Franco LJ, Vivolo MA, Negrato CA, Simoes AC, Ventureli CR (1993). Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. *Diabetes Care* 16: 701-704.
17. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 328: 750-753.
18. Palmer JP, Fleming GA, Greenbaum CJ, Herold KC, Jansa LD, Kolb H, Lachin JM, Polonsky KS, Pozzilli P, Skyler JS, Steffes MW. (2004). C-peptide is the Appropriate Outcome Measure for Type 1 Diabetes Clinical Trials to Preserve β -cell function. *Diabetes* 53: 250- 264.
19. Tsai EB, Sherry NA, Palmer JP, Herold KC (2006). The rise and fall of insulin secretion in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 49: 261-270.

-
20. Wahren J, Ekberg K, Jornvall H (2007). C-peptide is a bioactive peptide. *Diabetologia* 50: 503-509.
 21. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1998). Effect of intensive therapy on residual β -cell function in patients with type I diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 128: 517-523.
 22. Petrone A, Galgani A, Spoletini M, Alemanno I, Di Cola S, Bassotti G, Picardi A, Manfrini S, Osborn J, IMDIAB Group, Pozzilli P, Buzzetti R. (2005). Residual insulin secretion at diagnosis of type 1 diabetes is independently associated with both age, age at onset and HLA genotype. *Diabetes Metab Res Rev* 21: 271-275.
 23. Petrone A, Spoletini M, Zampetti S, Capizzi M, Zavarella S, Osborn J, Immunotherapy Diabetes (IMDIAB) group, Pozzilli P, Buzzetti R (2008). The PTNP22 1858 T gene variant in type 1 diabetes is associated with reduced residual β -cell function and worse metabolic control . *Diabetes Care* 31: 1214-1218.
 24. Törn C, Landin-Olsson M, Lernmark Å, Palmer JP, Arnqvist HJ, Blohmé G, Lithner F, Littorin B, Nyström L, Scherstén B, Sundkvist G, Wibell L, Östman J (2000). Prognostic Factors for the course of β cell function in Autoimmune Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4619-4623.
 25. Akerblom HK, Vaarala O, Hyoty H., Ilonen J, Knip M (2002). Environmental Factors in the Etiology of Type 1 Diabetes. *Am J Med Genet* 115:18-29.
 26. The EURODIAB Substudy 2 Study Group (1999). Vitamin D supplement in early childhood and risk for type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:51-54.
 27. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin M-R, Virtanen S (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358 (3):1500-1503.
 28. Zipitis CS, Akobeng AK (2008). Vitamin D Supplementation in Early Childhood and Risk fo Type 1 Diabetes: a Systematic Review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 93: 512-517.

29. Adams JS, Clemens TL, Parrish JA, Holick MF (1982). Vitamin-D synthesis and metabolism after ultraviolet irradiation of normal and vitamin D- deficient subjects. *N Engl J Med* 306: 722- 725.
30. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC (2008). The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia* 51: 1391-1398.
31. Mathieu C; Waer M, Laureys J , Rutgeerts O, Bouillon R (1994) Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D₃ *Diabetologia* 37: 552-558.
32. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, van Etten E, Decallone B, Overbergl L, Bouillon R, Mathieu C (2004) Vitamin D Deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 47: 451-462.
33. Pozzili P, Manfrini S, Crino A , Picardi A, Leomanni C, Cherubini V, Valente L, Khazrai M, Visalli N, IMDIAB group (2005). Low levels of 25-hydroxyvitamin D₃ e 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 37: 680-683.
34. Littorin B, Blom P, Scholin A, Arnqvist HJ, Blohmé G ,Bolinder J, Ekblom-Schnell A, Eriksson JW, Gudbjornsdottir S, Nystrom L, Ostman J, Sundkvist G (2006). Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 49: 2847-2852.
35. Almawi WY, Tamim H, Azar ST (1999). T helper Type 1 and 2 Cytokines Mediate the Onset and Progression of Type I (Insulin-dependent) Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1497-1502.
36. Kukreja A, Maclaren NK (1999). Autoimmunity and Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4371-4378.
37. Van Etten E, Decallone B, Bouillon R, Mathieu C (2004). NOD bone marrow-derived dendritic cells are modulated by analogs of 1,25 dihydroxyvitamin D₃. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90: 457- 459.

38. Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C (2000). 1 alpha,25 dihydroxivitamin D3 induces an autoantigen- specific T-helper 1/T helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes* 49 : 1301- 1307.
39. Gregori S, Giarratana N, Smioldo S, Uskokovic M, Adorini L (2002). A 1 alpha,25 dihydroxivitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51: 1367-1374.
40. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, Siniglaglia F, Panina- Bordignon P (1998). Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest* 101: 252-262.
41. Mathieu C, Adorini L (2002). The coming of age of 1,25 dihydroxivitamin D (3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 8: 174-179.
42. van Halteren AGS, Tysma OM, van Etten E, Mathieu C, Roep BO (2004). 1, α dihydroxivitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis. *J Autoimmun* 23: 233-239.
43. van Halteren AGS, van Etten E, de Jong EC, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C (2002). Redirection of human autoreactive T-cells upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1, α dihydroxivitamin D₃. *Diabetes* 51: 2119-2125.
44. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, Snehalatha C, Hitman GA (1997). Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indians Asians. *Diabetologia* 40:971-975.
45. Chang T-J, Lei H-H, Yeh J-I, Chiu KC, Lee K-C, Chen M-C, Tai T-Y, Chuang L-M (2000). Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol* 52:575-580.

-
46. Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M, Fukazawa T, Kasuga A, Hirose H, Matsubara K, Shimada A, Saruta T (2003). Vitamin D Receptor Gene Polymorphism Affects Onset Pattern of Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 3137- 3140.
 47. Shimada A, Kanazawa Y, Motohashi Y, Yamada S, Maruyama T, Ikegami H, Awata T, Kawasaki E, Kobayashi T, Nakanishi K, Kawabata Y, Kurihara S, Uga M, Tanaka S and the Japanese Study Group on Type 1 Diabetes Genetics (2008). Evidence for association between vitamin D receptor BsmI polymorphism and type 1 diabetes in Japanese. *J Autoimmun* 30: 207-211.
 48. Ban Y, Taniyama M, Yanagawa T, Yamada S, Maruyama T, Kasuga A, Ban Y (2001). Vitamin D receptor initiation codon polymorphism influences genetic susceptibility to type 1 diabetes in the Japanese Population. *BMC Medical Genetics* 2: 7.
 49. Gyorffy B, Vásárhelyi B, Krikovsky D, Madácsy L, Tordai A, Tulassay T, Szabó A (2002). Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 147: 803-808.
 50. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhop K (2000). Vitamin D Receptor Allele Combinations Influence Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes in Germans. *Diabetes* 49: 504-507.
 51. Audí L, Martí G, Esteban C, Oyarzabal M, Chueca M, Gussinyé M, Yeste D, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, Carrascosa A (2004). VDR gene polymorphisms at exon 2 start codon (FokI) may have influenced Type 1 diabetes mellitus susceptibility in two Spanish populations. *Diabet Med* 21: 393-399.
 52. Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine A-P, Simell O, Knip M, Veijola R, Ilonen J (2003). Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *Eur J Endocrinol* 149: 591-596.
 53. Zemunik T, Skarabic V, Boraska V, Diklic D, Terzic IM, Capkun V, Peruzovic M, Terzic J (2005). Fok I Polymorphism, Vitamin D Receptor, and Interleukin-1 Receptor haplotypes Are Associated With Type 1 Diabetes In the Dalmatian Population. *J Mol Diagn* 7: 600-604.

-
54. Skrabic V, Zemunik T, Situm M, Terzic J (2003). Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Res Clin Pract* 59: 31-35.
 55. Lemos MC, Fagulha A, Coutinho E, Gomes L, Bastos M, Barros L, Carrilho F, Geraldés E, Regateiro FJ, Carvalheiro M (2008). Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Hum Immunol* 69:134-138.
 56. Hauache OM, Lazaretti-Castro M, Andreoni S, Gimeno SGA, Brandão C, Ramalho A C, Kasamatsu TS, Kunii I, Hayashi LF, Dib SA, Vieira JGH (1998). Vitamin D Receptor Gene Polymorphism: Correlation with Bone Mineral Density in a Brazilian Population with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Osteoporos Int* 8: 204-210.
 57. Mimbacas A, Trujillo J, Gascue C, Javiel G, Cardoso H (2007). Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms in a Uruguayan population and its relation to type 1 diabetes. *Genet Mol Res* 6: 534-542.
 58. Angel B, Santos JL, Carrasco E, Albala C, Pérez-Bravo F (2004). Vitamin D receptor Polymorphism and susceptibility in type 1 diabetes in Chilean subjects: A case-parent study. *Eur J Epidemiol* 19: 1085-1087.
 59. Guo S-W, Magnuson VL, Schiller JJ, Wang X, Wu Y, Ghosh S (2006). Meta-analysis of Vitamin D Receptor polymorphisms and type 1 diabetes: A HuGE Review of Genetic Association Studies. *Am J Epidemiol* 164: 711-724.
 60. Ponsonby A-L, Pezic A, Ellis J, Morley R, Cameron F, Carlin J, Dwyer T (2008). Variation in Associations between Allelic Variants of the Vitamin D Receptor Gene and Onset of Type 1 Diabetes Mellitus by Ambient Winter Ultraviolet Radiation Levels: A Meta-Regression Analysis. *Am J Epidemiol* 168: 358- 365.
 61. Eisenbarth GS, Gottlieb PA (2004). Autoimmune polyendocrine syndromes. *N Engl J Med* 350: 2068- 2079.
 62. Perros P, McCrimmon RJ, Shaw G, Frier BM (1995). Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening. *Diabetic Med* 12: 622-627.

-
63. Umpierrez GE, Latif KA, Murphy MB, Lambeth HC, Stentz F, Bush A, Kitabchi AE. (2003) Thyroid Dysfunction in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 26: 1181- 1184.
 64. Barker JM (2006). Type 1 Diabetes-Associated Autoimmunity: Natural History, Genetic Associations, and Screening. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1210- 1217.
 65. Kordounori O, Hartmann R, Deiss D, Wilms, M, Gruters-Kieslich A (2005). Natural course of autoimmune thyroiditis in type 1 diabetes: association to gender, age, diabetes duration and puberty. *Arch Dis Child* 90: 411-414.
 66. González GC, Capel I, Rodríguez-Espinosa J, Mauricio D, De Leiva A, Pérez A (2007). Thyroid Autoimmunity at onset of Type 1 Diabetes as a Predictor of Thyroid Dysfunction. *Diabetes Care* 30: 1611-1612.
 67. Tomer Y (2002). Genetic dissection of familial autoimmune thyroid disease using whole genome screening. *Autoimmun Rev* 1: 198-204.
 68. Weetman AP (2004). Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* 61: 405-413.
 69. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies T (1999). Mapping the Major Suscetibility Loci for Familial Graves' and Hashimoto's Diseases: Evidence for Genetic Heterogeneity and Gene Interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4656-4664.
 70. Roman SH, Greenberg D, Rubinstein P, Wallenstein S, Davies TF (1992). Genetics of Autoimmune Thyroid Disease: Lack of Evidence for Linkage to HLA within Families. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 496-503.
 71. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ (1995). CTLA-4 Gene Polymorphism Associated with Graves' Disease in a Caucasian Population. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 41-45.
 72. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP (1997). A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 46: 551-554.

-
73. Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, Franklyn JA, Gough SC (2002). Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. *Thyroid* 12: 3-6.
 74. Tomer Y, Greenberg DA, Barbesino G, Concepcion E, Davies TF (2001). CTLA-4 and Not CD28 is a Suscetibility Gene for Thyroid Autoantibody Production. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1687-1693.
 75. Levin L, Tomer Y (2003). The etiology of autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common genetic susceptibility. *Autoimm Rev* 2: 377-386.
 76. Holl RW, Bohm B, Loos U, Grabert M, Heinze E, Homoki J (1999). Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. Effect of Age, Gender and HLA type. *Horm Res* 52: 113-8.
 77. Chuang L-M, Wu H-P, Chang C-C, Tsai W-Y, Chang H-M, Tai T-Y, Lin BJ (1996). HLA DRB1/ DQA1/ DQB1 haplotype determines thyroid autoimmunity in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 45: 631-6.
 78. Chikuba N, Akazawa S, Yamaguchi Y, Kawasaki F, Takino H, Yoshimoto M, Ohe N, Yamashita K, Yano A, Nagataki S (1995). Immunogenetic heterogeneity in type 1 (insulin-dependent) diabetes among Japanese class II antigen and autoimmune thyroid disease. *Diabetes Res Clin Pract* 27: 31-37.
 79. Awata T, Katsuren E, Matsumoto C, Nagayama I, Uchigata Y, Kuzuya N, Kanazawa Y (1995). Absence of shared HLA class II (DR,DQ)- Linked Genetic Basis between IDDM and Autoimmune Thyroid Disease in Japanese. *Diabetes Care* 18: 582.
 80. Djilali-Saiah I, Bertin E, Larger E, Timsit J, Assan R, Boitard C, Bach J-F, Caillat-Zucman S. (1998). Major histocompatibility class II genes polymorphism in insulin-dependent diabetes mellitus with or without associated thyroid autoimmunity. *Hum Immunol* 59: 176-182.

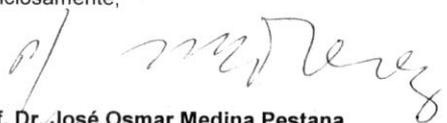
81. Takara M, Komiya I, Kinjo Y, Tomoyose T, Yamashiro S, Akamine H, Masuda M, Takasu N (2000). Association of CTLA-4 gene A/G polymorphism in Japanese type 1 diabetic patients with younger age of onset and autoimmune thyroid disease. *Diabetes Care* 23: 975-978.
82. Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, Herwig J, Usadel KH, Badenhoop K (1997). CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 143-146.
83. Ban Y, Taniyama M, Ban Y. (2001). Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Hashimoto's Thyroiditis. *Thyroid* 11: 607-608.
84. Ban Y, Taniyama M, Ban Y. (2000). Vitamin D Receptor Gene Polymorphism is associated with Graves' Disease in the Japanese Population. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 4639-4643.
85. Ban Y, Ban Y, Taniyama M, Katagiri T (2000). Vitamin D receptor initiation codon polymorphism in Japanese patients with Graves' disease. *Thyroid* 10: 475-480.
86. Ramos-Lopez E, Kurylowicz A, Bednarczuk T, Paunkovic J, Seidl C, Badenhoop K. (2005). Vitamin D Receptor Polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. *Thyroid* 15: 1125-1130.
87. Thomson G, Valdes AM, Noble JA, Kockum I, Grote M N, Najman J, Erlich HA, Cucca F, Pugliese A, Steenkiste A, Dorman JS, Caillat-Zucman S, Hermann R, Ilonen J, Lambert AP, Bingley PJ, Gillespie KM, Lernmark Å, Sanjeevi CB, Rønningen KS, Undlien DE, Thorsby E, Petrone A, Buzzetti R, Koeleman BPC, Roep BO, Saruhan-Direskeneli G, Uyar FA, Günoz H, Gorodezky C, Alaez C, Boehm BO, Mlynarski W, Ikegami H, Berrino M, Fasano ME, Dametto E, Israel S, Brautbar C, Santiago-Cortes A, Frazer de Llado T, She J-X, Bugawan TL, Rotter JI, Raffel L, Zeidler A, Leyva-Cobian F, Hawkins BR, Chan SH, Castano L, Pociot F, Nerup J (2007). Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens* 70:110-127.

-
88. Yokota I, Satomura S, Kitamura S, Taki Y, Naito E, Ito M, Nisisho K, Kuroda Y. (2002). Association between Vitamin D receptor genotype and age of onset in juvenile patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25: 1244.
 89. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ (2003). Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 100: 177-182.
 90. Boursolon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A. Influence of vitamin D₃ deficiency and 1,25 dihydroxvitamin D₃ on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol* 1999 160: 87-95.
 91. Kajikawa M, Ishida H, Fujimoto S, Mukai E, Nishimura M, Fujita J, Tsuura Y, Okamoto Y, Norman AW, Seino Y (1999). An Insulinotropic Effect of Vitamin D Analog with Increasing Intracellular Ca²⁺ Concentration in Pancreatic β-Cells through Nongenomic Signal Transduction. *Endocrinology* 140: 4706-4712.
 92. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG (2003). Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J* 17: 509-511.
 93. Gysemans C, van Etten E, Overbergh L, Giulietti A, Eelen G, Waer M, Verstuyf A, Bouillon R, Mathieu C. (2008). Unaltered Diabetes Presentation in NOD Mice lacking the Vitamin D receptor. *Diabetes* 57: 269-275.
 94. Eisenbarth G. Type 1 diabetes mellitus (1986). A chronic auto-immune disease. *N Engl J Med* 314: 1360-1368.
 95. Sabbah E, Savola K, Kulmala P, Veijola R, Vähäsalo P, Karjalainen J, Åkerblom HK, Knip M and The Childhood Diabetes in Finland Study Group (1999). Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1534- 1539.
 96. Milner RD, Hales CN (1967). The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro. *Diabetologia* 3: 47-49.
 97. Seino Y, Ishida H. (1995). Diabetic osteopenia. Pathophysiology and clinical aspects. *Diabetes Metab Rev* 11: 21-35.

-
98. Paula FJA, Lanna CMM, Shuhama T, Foss MC (2001). Effect of metabolic control on parathyroid hormone secretion in diabetic patients. *Braz J Med Biol Res* 34:1139-1145.
 99. Gedik O, Akalin S (1986). Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagons secretion in man. *Diabetologia* 29: 142-145.
 100. Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJW (1995). Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in East London Asians. *Diabetologia* 38: 1239-1245.
 101. Bandeira F, Griz J, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E (2006). Vitamin D deficiency: A Global Perspective. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50: 640-646.
 102. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araújo LM, Vieira JG, Kunii I, Hayashi LF, Correa MP, Lazaretti- Castro M. (2005). Influence of ultraviolet radiation on production of 25 hydroxivitamin D in the elderly population in the city of São Paulo (23° 34'S) Brazil. *Osteoporos Int* 16: 1649-1654.
 103. Maeda SS, Kunii IS, Hayashi L, Lazaretti- Castro M. The effect of sun exposure on 25-hydroxivitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of São Paulo, Brazil (2007). *Braz J Med Biol Res* 40 (12): 1653-1659.
 104. Barker JM, Yu J, Yu L, Wang J, Miao D, Bao F, Hoffenberg E, Nelson JC, Gottlieb PA, Rewers M, Eisenbarth G (2005). Autoantibody “sub-specificity “ in type 1 diabetes: risk for organ specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes Care* 28: 850-855.
 105. Araujo J, Brandão LA, Guimarães RL, Santos S, Falcão EA, Milanese M, Segat L, Souza PR, de Lima-Filho JL, Crovella S (2008). Prevalence of Autoimmune Thyroid Disease and Thyroid Dysfunction in Young Brazilian Patients with Type 1 Diabetes. *Pediatr Diabetes* 9: 272-276.
 106. Glastras SJ, Craig ME, Verge CF, Chan AK, Cusumano JM, Donaghue KC (2005). The Role of Autoimmunity at Diagnosis of Type 1 Diabetes in the Development of Thyroid and Celiac Disease and Microvascular Complications. *Diabetes Care* 28: 2170-2175.

-
107. Kordounori O, Klinghammer A, Lang EB, Gruters-Kieslich A, Grabert M, Holl RW, on Behalf of the DPV-Initiative of the German Working Group for Pediatric Diabetology (2002). Thyroid Autoimmunity in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 25: 1346-1350.
 108. Howson JMM, Dunger DB, Nutland S, Stevens H, Wicker LS, Todd JA (2007) A type 1 diabetes subgroup with a female bias is characterised by failure in tolerance to thyroid peroxidase at an early age and a strong association with the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene. *Diabetologia* 50: 741-746.
 109. Fernández- Castañer M, Molina A, López-Jiménez L, Gómez JM, Soler J. (1999) Clinical Presentation and early course of type 1 diabetes in patients with and without thyroid autoimmunity. *Diabetes Care* 22: 377-381.
 110. Rattarasarn C, Diosdado MA, Ortego J, Leelawattana R, Soonthornpun S, Setasuban W, Jaruratanasirikul S, Patarakijvanich N (2000). Thyroid autoantibodies in Thai type 1 diabetic patients: clinical significance and their relationship with glutamic acid decarboxylase antibodies *Diabetes Res Clin Pract* 49: 107-111.
 111. Bárová H, Perusicová J, Hill M, Sterzl I, Vondra K, Masek Z (2004). Anti-GAD-Positive Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Have Higher Prevalence of Autoimmune Thyroiditis than Anti-GAD-Negative Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes mellitus. *Physiol Res* 53: 279-286.
 112. Zipris D, Greiner DL, Malkani S, Whalen B, Mordes JO, Rossini AA (1996). Cytokine gene expression in islets and thyroid of BB rats. *J Immunol* 156: 1315-1321.

ANEXOS**Anexo 1: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.**

	<i>Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina</i>	<i>Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo</i>
São Paulo, 12 de setembro de 2003. CEP 0814/03		
Ilmo(a). Sr(a). Pesquisador(a) DENISE BARRETTO MORY Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo		
Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Pesquisa do polimorfismo do gene do receptor da vitamina D e relação com os marcadores de auto-imunidade contra a célula beta em indivíduos com diabetes melito tipo 1 brasileiros" .		
Prezado(a) Pesquisador(a),		
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa acima referenciado.		
Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:		
<ol style="list-style-type: none">1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.4. Apresentar primeiro relatório parcial em 10/março/2004.5. Apresentar segundo relatório parcial em 06/setembro/2004.		
Atenciosamente,		
		
Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo		
"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."		
Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162		

Anexo 2: Comprovante de submissão do artigo 2.

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log C](#)

Thyroid

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

You are logged in

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Thyroid*.

 VeriSign has routed, processed, and secured your payment information. [More information](#)
VeriSign

Manuscript ID: THY-2008-0317

Title: Analysis of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism FokI in Brazilian Type 1 Diabetic Patients with Autoimmune Thyroid Disease

Authors: Mory, Denise
Rocco, Eloá
Kasamatsu, Teresa
Crispim, Felipe
Miranda, Walkíria
Dib, Sérgio

Date Submitted: 11-Sep-2008

Payment method: Denise Mory
CC 85.00 USD\$
Visa XXXXXXXXXXXXX2001
Payment received on: 11-Sep-2008

Auth. Number: VXJF2E79FF00

 [Print](#)  [Return](#)

Manuscript Central™ v4.11 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2008. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

De: <thyroid@thyroid.org>
Para: <sergio.dib@unifesp.br>
Enviada em: segunda-feira, 6 de julho de 2009 17:38
Assunto: THYROID - Manuscript ID THY-2008-0317.R1

06-Jul-2009

Dear Dr. Dib:

Your manuscript entitled "Analysis of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism FokI in Brazilian Type 1 Diabetic Patients with Autoimmune Thyroid Disease" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Thyroid.

Your manuscript ID is THY-2008-0317.R1.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/thyroid> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/thyroid>.

Thank you for submitting your manuscript to Thyroid.

Sincerely,
Thyroid Editorial Office

Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido.**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Projeto de Pesquisa: Relação do Polimorfismo do Gene do Receptor da Vitamina D com a Função da Célula Beta Pancreática no Diabetes Melito Tipo 1.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa pesquisar nos indivíduos com Diabetes Melito Tipo 1 uma variação no gene do receptor da vitamina D, em comparação com pessoas que não tem Diabetes.

Para isso será realizada coleta de amostra de sangue por punção periférica por veia de antebraço, com coleta de 25 mL de sangue.

Será realizada extração de DNA para pesquisa da variação genética, dosagem de anticorpos contra a célula beta pancreática (anti-GAD e anti-IA2), glicemia, TSH, anticorpo antiperoxidase (anticorpo contra a tireóide) e cálcio, com desconforto leve.

Será realizada dosagem de peptídeo-C basal e após refeição padronizada para avaliar a produção de insulina, com desconforto leve.

Não há benefício direto para o participante.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso ao pesquisador responsável para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Dra. Denise Barretto Mory, que pode ser encontrada no Centro de Diabetes na Rua Coronel Lisboa, 826 e telefone 5085-0199. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 e e-mail: cepunifesp@epm.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente, tendo direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Comprometo-me a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Relação do Polimorfismo do Gene do Receptor da Vitamina D com a Função da Célula Beta Pancreática no Diabetes Melito Tipo 1** “. Eu discuti com o Dra. Denise Barretto Mory sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo 4: Intervalos de 95% de confiança para as frequências dos genótipos do VDR *BsmI* e *FokI*.

n	Genótipo VDR <i>BsmI</i>	evento	%	limite inferior	limite superior
DM1					
177	BB	60	33,9	26,9	40,9
177	Bb	57	32,2	25,3	39,1
177	bb	60	33,9	26,9	40,9
Controles					
182	BB	38	20,9	15,0	26,8
182	Bb	74	40,7	33,5	47,8
182	bb	70	38,5	31,4	45,5

n	Genótipo VDR <i>FokI</i>	evento	%	limite inferior	limite superior
DM1					
177	FF	80	45,2	37,9	52,5
177	Ff	81	45,8	38,4	53,1
177	ff	16	9,0	4,8	13,3
Controles					
183	FF	91	49,7	42,5	57,0
183	Ff	67	36,6	29,6	43,6
183	ff	25	13,7	8,7	18,6

Anexo 5: Dados clínicos e laboratoriais do grupo controle.

Anexo 6: Dados clínicos e laboratoriais do grupo com DM1.

Anexo 7: Composição segundo a raça, de acordo com a classificação do IBGE, do grupo DM1 e grupo controle

	DM1	Controles
n	171	194
Caucasóide, n (%)	109 (63,7%)	51 (26,3%)
Pardo, n (%)	54 (31,6%)	122 (62,9%)
Negróide, n (%)	5 (2,9%)	17 (8,8%)
Amarelo, n (%)	2 (1,2%)	2 (1,0%)
Indígena, n (%)	1 (0,6%)	2 (1,0%)

p < 0,001

ABSTRACT

The discovery of receptors for $1\alpha,25$ dihydroxivitamin D₃, the activated form of vitamin D, in pancreatic beta cells and cells of the immune system, has broadened the view of the role of this hormone. It acts through activation of the vitamin D receptor (VDR) that is encoded by a gene located in chromosome 12q-12. Several polymorphisms have been described for VDR gene but studies using these polymorphisms as genetic markers of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and autoimmune thyroid disease showed controversial results.

We studied the frequency of VDR *FokI* (rs10735810) and *BsmI* (rs154410) in T1DM individuals and their relationship to residual beta cell function. The frequency of VDR *FokI* polymorphism was similar between T1DM and control group (C), however, we found lower residual beta cell function in T1DM with homozygosis or heterozygosis for this polymorphism (5.8% vs. 14.3%, genotypes ff plus Ff vs. FF, $p=0.07$), with similar clinical and laboratory characteristics. The *BsmI* was more frequent in the C (bb plus Bb genotypes 79.1% C vs. 66.1% T1DM, $p=0.006$) but T1DM with this polymorphism were older at clinical diagnosis (10.7 ± 4.9 vs 9.3 ± 4.5 y.o, genotypes bb plus Bb vs. BB, $p=0.061$).

In addition, we analyzed the VDR Polymorphism *FokI* (rs10735810) in Brazilian T1DM with Thyroid Dysfunction (TD), considered as both hypothyroidism and hyperthyroidism. We observed higher prevalence of this polymorphism in individuals with associated T1DM and TD (ff and Ff genotypes 73.9% with TD vs. 52.7 % without TD, $p=0.05$). TD was more prevalent in female T1DM patients (72 % vs. 48.4 %, $p=0.02$), and we also observed higher frequency of positivity to TPOAb (80% with TD vs. 25% without TD, $p < 0.001$) and to GADAb (56% with TD vs. 30.3% without TD, $p=0.01$).

In conclusion, Brazilian T1DM patients with VDR *FokI* polymorphism had lower residual beta cell function and those with *BsmI* were older at clinical diagnosis. These associations may contribute to heterogeneity of results found in relationships studies of vitamin D and T1DM.

Moreover, clinical characteristics and laboratory data of T1DM associated with thyroid dysfunction were similar with known data from literature.

However, we observed in those patients a higher frequency of VDR *FokI* polymorphism, suggesting that this VDR polymorphism could be responsible by a part of the common mechanisms present in these two frequent endocrine autoimmune diseases and its relation with vitamin D.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)