



Artigo de Revisão Bibliográfica

Mestrado Integrado em Medicina

## **A INFLUÊNCIA DA VITAMINA D NA PATOGÊNESE DA DIABETES MELLITUS TIPO 1**

---

**Autor:** Andreia de Oliveira Ramalho

**Orientador:** Dra. Teresa Maria da Silva Borges Gonçalves Ferreira

Afiliação: Instituto de Ciências Abel Salazar / Centro Hospitalar do Porto  
Universidade do Porto

Endereço: Largo Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto

Junho/2013

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina submetida ao  
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

## **A INFLUÊNCIA DA VITAMINA D NA PATOGÉNESE DA DIABETES MELLITUS TIPO 1**

---

Andreia de Oliveira Ramalho

Orientadora – Dra. Teresa Maria da Silva Borges Gonçalves Ferreira  
Categoria – Professora Afiliada no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar  
e Assistente Hospitalar Graduado de Pediatria  
Afiliação – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

## **Agradecimentos**

*À Dra. Teresa Borges, por todo o empenho e incentivo, pela constante disponibilidade e transmissão de conhecimentos.*

*Ao André, pelo companheirismo, compreensão e otimismo incondicionais.*

*Aos meus pais e irmã, por acreditarem em mim e apoiarem os meus sonhos.*

*À Cecília e Andreia M., que coloriram este longo percurso.*

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>Palavras-chave</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>Keywords</b> .....	2
<b>SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>A. VITAMINA D</b> .....	6
I. Metabolismo e Mecanismo de ação da Vitamina D .....	6
II. Insuficiência, Deficiência e Toxicidade da Vitamina D. Níveis recomendados .....	8
III. Consequências da deficiência de Vitamina D a nível esquelético e não esquelético .	9
<b>B. DIABETES MELLITUS TIPO 1</b> .....	11
I. Patogénese .....	12
<b>C. VITAMINA D E DIABETES MELLITUS TIPO 1</b> .....	14
I. Suplementos com Vitamina D ou análogos e a DM1 .....	15
a. Modelos animais.....	15
b. Modelos humanos .....	16
II. Imunomodulação da Vitamina D .....	18
III. Genética, Vitamina D e DM1 .....	19
a. Recetor da Vitamina D .....	20
b. Enzimas metabolizadoras da vitamina D .....	21
c. Proteína de ligação da vitamina D.....	22
<b>CONCLUSÃO</b> .....	24
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	25

## RESUMO

*Introdução:* A diabetes mellitus tipo 1 é a segunda doença crónica mais comum em crianças e a sua incidência tem vindo a aumentar. Os fatores nela envolvidos não são ainda bem compreendidos, mas estudos sugerem a influência da vitamina D na sua patogénese.

*Objetivos:* Rever a literatura científica sobre a influência da vitamina D na diabetes mellitus tipo 1, através da análise dos diferentes estudos epidemiológicos e experimentais realizados, assim como da identificação dos possíveis mecanismos nela envolvidos.

*Desenvolvimento:* A vitamina D é obtida quer endogenamente através da exposição solar, quer exogenamente através de fontes alimentares (<10 %). As funções ao nível da homeostasia do cálcio e fosfato são já bem conhecidas. A existência de recetores de vitamina D em vários tecidos, assim como o seu papel ao nível do sistema imune, foram descobertos recentemente e permitiram relacioná-la com outros processos fisiológicos e patologias, nomeadamente diversas doenças imunológicas (na qual se inclui a diabetes mellitus tipo 1), cardiovasculares, metabólicas, entre outras. A diabetes mellitus tipo 1 é uma doença crónica autoimune, caracterizada pela destruição seletiva e progressiva das células  $\beta$  do pâncreas, produtoras de insulina. Da sua etiologia fazem parte múltiplos fatores genéticos e ambientais. Diversos estudos sugerem uma associação entre o défice de vitamina D e esta patologia, podendo esta ser justificada pelo efeito modulador desta vitamina e por diversos polimorfismos existentes ao nível do seu recetor, das enzimas envolvidas no seu metabolismo e das suas proteínas transportadoras.

*Conclusão:* Não obstante as várias evidências que comprovam esta associação, mais estudos são necessários com vista à exploração dos vários mecanismos envolvidos na patogénese desta doença autoimune, de forma a que o papel da vitamina D seja claramente determinado.

**Palavras-chave:** Vitamina D, diabetes mellitus tipo 1, patogenia, suplementos de vitamina D, polimorfismos, imunomodulação.

## **ABSTRACT**

*Introduction: Diabetes mellitus type 1 is the second most common chronic disease in children and its incidence has been increasing. The factors involved in it are not well understood, but studies suggest the influence of vitamin D in their pathogenesis.*

*Objectives: To review the literature on the influence of vitamin D in diabetes mellitus type 1, through the analysis of different epidemiological and experimental studies, as well as the identification of possible mechanisms involved in it.*

*Development: Vitamin D is obtained either endogenously through sun exposure, or exogenously from dietary sources (<10%). The functions in calcium and phosphate homeostasis are well known. The existence of the vitamin D receptor in various tissues, as well as its role on the immune system have been discovered recently and allowed to relate it to other physiological processes and disorders, including various autoimmune diseases (in which is included diabetes mellitus type 1), cardiovascular diseases, metabolic diseases, amongst others. Diabetes mellitus type 1 is a chronic autoimmune disease characterized by selective and progressive destruction of  $\beta$  cells in the pancreas that produce insulin. Multiple genetic and environmental factors contribute to its etiology. Several studies suggest an association between vitamin D deficiency and this disease, which may be justified by the modulating effect of this vitamin and several polymorphisms existing on their receptor, in enzymes involved in their metabolism and their carrier proteins.*

*Conclusion: Despite the various evidence supporting this association, further studies are needed to exploit the various mechanisms involved in the pathogenesis of this autoimmune disease, so that the role of vitamin D is clearly determined.*

**Keywords:** *Vitamin D, type 1 diabetes, pathogenesis, vitamin D supplements, polymorphisms, immunomodulation.*

## SIGLAS E ABREVIATURAS

1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D – 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D ou calcitriol

25(OH)D – 25-hidroxitamina D

APC - células apresentadoras de antígenos

BB – *BioBreeding*

cr - cromossoma

CYP2R1 – Vitamina D 25-hidroxilase ou 25-Ohase

CYP27B1 – CYP1 $\alpha$ , 1-Ohase ou 25-hidroxitaminaD<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hidroxilase

CYP24A1 – 25(OH)D 24-hidroxilase ou 24-Ohase

DBP – proteína de ligação da vitamina D

DM1 – Diabetes tipo 1

DM2 – Diabetes tipo 2

GAD<sub>65</sub> – *glutamic acid decarboxylase*

Gc - *Group-specific component*

HbA1c – hemoglobina glicosilada

HLA – antígenos de leucócitos humanos

IA-2A – *protein tyrosine phosphatase-like antibody*

ICA - *islet cell antibody*

IFN – interferão

IL – interleucina

MHC – complexo de histocompatibilidade major

NOD – *non-obese diabetic*

NOD.SCID – *non-obese diabetic. severe combined immunodeficiency*

PTH – *parathyroid hormone*

PTPN22 – gene da insulina que codifica a proteína tirosina fosfatase

RXR – *retinoid X receptor*

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

Th – células T auxiliares

TNF – fator de necrose tumoral

T-NK – célula T *natural killer*

Treg – células T reguladoras CD4+CD25+

UI – unidades internacionais

UVB – radiação ultravioleta B

UVR – radiação ultravioleta

VDR – *vitamin D receptor*

VDRE – *vitamin D responsive element*

## INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença crônica autoimune que resulta da destruição, seletiva e progressiva, das células beta pancreáticas, secretoras de insulina. (1,2,3) A destruição destas células pode começar vários anos antes da DM1 ser diagnosticada. (4)

Sendo a segunda doença crônica mais comum em crianças, depois da asma, (5,6,7) a DM1 afeta principalmente a população mais jovem. (7) Cerca de 35 milhões de pessoas em todo o mundo padecem desta doença, e sua incidência apresenta variação geográfica significativa. (8,9) Ela é mais comum em pessoas de ascendência europeia (10,11), afetando 2 milhões de pessoas na Europa e América do Norte. Verifica-se também que uma criança na Finlândia (país com maior incidência de DM1) (12), comparativamente a uma na Venezuela tem cerca de 400 vezes mais hipóteses de vir a adquirir a doença. (11) Calcula-se que atualmente a incidência esteja a aumentar cerca de 3% ao ano. (1,11,13,14).

É geralmente aceite que tanto fatores genéticos como ambientais contribuem para o desenvolvimento da doença. (3,4,8,10,11,15,16) Indivíduos com parentes de primeiro grau afetados são mais propensos a desenvolver DM1 do que a população em geral, apontando para uma importante influência genética. No entanto, a baixa concordância entre gémeos idênticos e o fato de muitas crianças com predisposição genética para a doença não a desenvolverem sugere que os fatores ambientais também são importantes. (1,17) Um dos fatores ambientais que se pensa ser protetor contra o desenvolvimento de DM1 é a vitamina D. (1)

Apesar de inicialmente ser denominada como uma "vitamina", a vitamina D é uma vitamina não pura, porque os seus requisitos não são somente satisfeitos através do consumo de alimentos que a contêm, mas principalmente por síntese pelo organismo através da exposição solar cutânea. (18) A vitamina D é mais corretamente um precursor de uma hormona esteróide, o calcitriol. (19)

Vários estudos têm apontado a deficiência de vitamina D como um problema de saúde pública global. O défice infantil de vitamina D é comum nos países árabes/sul da Ásia, incluindo o Kuwait e Índia. Além disso, no Reino Unido, tem havido um ressurgimento do raquitismo e há relatos de adolescentes com sintomas de deficiência de vitamina D. Alimentação materna prolongada sem suplementação de vitamina D,



deficiência materna de vitamina D e exposição limitada ao sol têm sido sugeridos como principais fatores de risco. (8)

Estima-se que 1 bilhão de pessoas em todo o mundo tenham deficiência ou insuficiência de vitamina D. (20,21) Em Portugal, Tojal Monteiro (22) conduziu um estudo com o objetivo de verificar o estado nutricional da vitamina D em crianças residentes no Grande Porto. Após o primeiro ano de vida nenhuma criança recebeu suplemento farmacológico de vitamina D. Das 45 crianças avaliadas, 20% tinham um nível ideal (>40ng/ml), 53% suficiente (30-40 ng/ml), 13% insuficiência relativa (20-29,6 ng/ml) e 13% deficiência (<20ng/ml). Deste modo, foi encontrada carência de vitamina D em 26% da população estudada, nos meses com menos sol.

Nos últimos anos, a vitamina D tem sido sugerida como tendo um efeito benéfico para uma grande variedade de condições em adição ao seu papel bem definido ao nível ósseo.(4) A descoberta de recetores de  $1\alpha,25\text{-di-hidroxivitamina D}_3$  ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ou calcitriol), a forma ativa da vitamina D, em tecidos sem papel direto no metabolismo do cálcio (por exemplo, células beta pancreáticas e células do sistema imune) ampliou a nossa visão do seu papel fisiológico. (23) A deficiência de vitamina D tem sido associada a um risco aumentado de cancro comuns (24), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (25) e doenças autoimunes, incluindo esclerose múltipla, artrite reumatóide e DM1. (26, 27)

Tendo em conta as taxas crescentes de DM1 e as consequências futuras que dela advém, torna-se de extrema importância o melhor conhecimento da sua patogénese, de forma a que novas medidas de prevenção e gestão da doença possam ser tomadas. Esta revisão bibliográfica, baseada numa pesquisa no Pubmed e Medline, sem limitação de datas e com seleção dos artigos escritos em português e inglês, tem como objetivos rever a importância da vitamina D ao nível da patogénese da DM1, pela análise dos diversos estudos que abordam esta relação, assim como os que relacionam a suplementação com vitamina D ou análogos e a DM1, para além da análise dos diferentes mecanismos possivelmente nela envolvidos.

## A. VITAMINA D

A vitamina D é uma substância lipofílica, (5,14) classificada quimicamente como um esteróide.(18)

A vitamina D pode ser obtida por produção endógena, através da exposição da pele à luz solar,(28,29) ou exogenamente por ingestão de alimentos e suplementos. (1,27,30,31) As melhores fontes alimentares são os peixes gordos (18,19,32,33) ou óleos de fígado de bacalhau. Mesmo em países com alimentos enriquecidos com esta vitamina, a sua ingestão isolada geralmente é insuficiente para manter os níveis séricos adequados. (20,31) O leite materno contém pouca vitamina D (embora a sua concentração seja influenciada pela concentração da vitamina na mãe) (1,30), razão pela qual se recomenda um suplemento desta vitamina para crianças amamentadas. (1) A suplementação é também indicada noutras situações consideradas de risco de défice de vitamina D, tais como gravidez e infância. (34)

A pele produz mais de 90% da vitamina D necessária. (33) Esta produção depende do comprimento de onda da radiação ultravioleta (290-315nm) e do número de fótons absorvidos, (24,32) pelo que fatores como a reduzida exposição aos raios UVB, o aumento da pigmentação da pele, o uso de filtros solares e o ângulo da luz solar que atinge a superfície da Terra (ângulo de zénite) afetam este processo.(24,31) O ângulo zenital é dependente da hora do dia, estação do ano e latitude. A radiação ultravioleta necessária para sintetizar a vitamina D é bloqueada pela atmosfera, quando o sol não sobe mais de 35° acima do horizonte. Portanto, a síntese de vitamina D é prejudicada de manhã e à noite, durante os meses de inverno e mais ainda nos países de maior latitude. (24,32)

Para além disso, certas condições clínicas podem influenciar os níveis séricos de vitamina D, tais como síndromes intestinais de má absorção de gordura (por exemplo, doença inflamatória intestinal) (31); medicamentos (ex. glicocorticóides) ou obesidade. (5)

### I. Metabolismo e Mecanismo de ação da Vitamina D

Durante a exposição à luz solar, a radiação UVB é absorvida pelo 7-desidrocolesterol (18,33), que está presente nas membranas plasmáticas dos queratinócitos epidérmicos e dos fibroblastos dérmicos. A energia é absorvida, resultando

na reorganização das ligações duplas e abertura do seu anel B para formar pré-vitamina D<sub>3</sub>.(18,33) Uma vez formada, a pré-vitamina D<sub>3</sub>, rapidamente sofre rearranjo das suas ligações duplas para formar a vitamina D<sub>3</sub>, mais termodinamicamente estável. Durante este processo, a vitamina D<sub>3</sub> é ejetada a partir da membrana plasmática para o espaço extracelular. (33) A vitamina D, produzida na pele, assim como a obtida pela alimentação, entra na circulação ligada a proteínas de ligação da vitamina D (DBP) e lipoproteínas, é libertada para o fígado e hidroxilada para formar 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], (5,27,30,33) pela CYP2R1 (vitamina D 25-hidroxilase ou 25-Ohase).(24,32,33,34) A exposição prolongada ao sol não resulta na produção de quantidades excessivas de vitamina D<sub>3</sub> capaz de causar intoxicação, já que, durante a exposição solar, a pré-vitamina D<sub>3</sub> que é formada e a isomerização térmica do produto da vitamina D<sub>3</sub>, que não escapa para a circulação, absorvem a radiação UV solar e isomerizam-se em diversos fotoprodutos que se pensa terem pouca atividade sobre o metabolismo do cálcio. (33)

Os níveis de vitamina D são rotineiramente determinados pela concentração de 25(OH)D, (5,30,33,34) a forma inativa circulante de vitamina D, que tem uma semivida de cerca de 2 semanas.(24,27,32) A 25(OH)D é hidroxilada, principalmente no rim,(18) pela enzima CYP27B1 (1-Ohase ou 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilase) para formar 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, (5,24,27,32,33,34) a forma biologicamente ativa responsável pela manutenção da homeostasia do cálcio e fósforo.(27)

Uma variedade de fatores, incluindo a PTH, o fósforo, (33) o cálcio, bem como a própria 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, (24) regulam a produção renal de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Esta regula o metabolismo de cálcio através de interações com os seus principais tecidos-alvo, ou seja, ossos e intestino. 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> também induz a sua própria destruição através do aumento da expressão de CYP24A1 (24-Ohase ou 25(OH)D 24-hidroxilase). (32,33)

Além do rim, muitos tecidos e células, como mama, pâncreas, macrófagos,(5) placenta, células ósseas (35) e células dendríticas (23) que não desempenham um papel no metabolismo do cálcio, expressam CYP27B1, (24) podendo igualmente produzir 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. (5)

O mecanismo da ação da vitamina D é mediada pela ligação de alta afinidade da 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ao recetor da vitamina D (VDR), que forma heterodímeros VDR/RXR (*retinoid X receptor*). Após a translocação para o núcleo, o complexo liga-se a VDRE (*vitamin D responsive element*), (7,18) existente em genes alvo que participam em diversos processos, incluindo a proliferação celular, diferenciação e imunomodulação. (7)

O VDR existe em vários outros tecidos, para além do osso e do rim, tais como coração, fígado, mama, células beta do pâncreas, tiróide, glândulas suprarrenais, células do sistema imunológico, cérebro, ovários e testículos. (24,33)

## **II. Insuficiência, Deficiência e Toxicidade da Vitamina D. Níveis recomendados**

Como já foi referido, a 25(OH)D é o marcador estabelecido para avaliar a vitamina D. Como a forma biologicamente ativa da vitamina D é a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , seria de esperar que a sua medição fosse um melhor indicador, no entanto, por várias razões, tal não acontece: tem uma semivida curta (4-6 horas), os seus níveis circulatórios são baixos e a sua concentração não se correlaciona com a da vitamina D em estados com PTH altos. (33)

As opiniões divergem sobre como definir os níveis ótimos de 25(OH)D (34,36). No entanto, na maioria dos estudos é considerado deficiência de vitamina D quando a 25(OH)D desce abaixo de 20 ng/ml (50 nmol/L), insuficiência quando a concentração se mantém entre 21 e 29 ng/ml e o termo suficiência refere-se a níveis acima de 30 ng/ml (75 nmol/L). (5,20,37) No entanto, muitos autores afirmam que níveis mais elevados são necessários quer na saúde óssea (26), quer no contexto da diabetes, outras doenças imunes e cancro. (7,36)

O *Institute of Medicine* (IOM) recomenda que a ingestão de vitamina D para crianças abaixo de 1 ano de idade seja de 400 UI/dia, 600 UI/dia todos os indivíduos entre 1 e 70 anos e 800 UI/dia a partir dos 70 anos. (112) Contudo, permanece por esclarecer se estas doses serão suficientes para causar os benefícios extra-esqueléticos da vitamina D. (39) Cada 100 UI de vitamina D adicional ingerida por via oral diariamente produz uma elevação de 25(OH)D de cerca de 1 ng / ml (2.5nmol / L). (40)

Com as recomendações que apontam para um aumento das necessidades de ingestão de vitamina D surge a preocupação com o risco de hipervitaminose. Todavia, deve ser referido que a intoxicação por vitamina D é extremamente rara, acreditando-se que resulte maioritariamente da ingestão excessiva de altas doses de suplementos que contêm vitamina D. (41) Os níveis tóxicos de 25(OH)D nunca foram estabelecidos, mas os casos de intoxicação surgiram sempre com níveis muito superiores a 100 ng/ml, associados a hipercalcemia e hiperfosfatemia. (33)

### III. Consequências da deficiência de Vitamina D a nível esquelético e não esquelético

A vitamina D é um componente importante na interação entre o rim, o osso, a hormona paratiróide e o intestino, de forma a assegurar a homeostasia do cálcio e fósforo. (18) Sem vitamina D, o intestino delgado não absorve mais do que 10-15% do cálcio na dieta. Numa pessoa com suficiência de vitamina D, o intestino delgado absorve, em média, 30% de cálcio na dieta, e durante o crescimento, gravidez e lactação a eficiência aumenta para 80%. (32)

A diminuição da absorção de cálcio, decorrente da deficiência de vitamina D, provoca um aumento da PTH que leva a um aumento da reabsorção renal de cálcio e a uma perda de fósforo na urina, estimulação da CYP27B1 renal (com aumento da concentração de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), transformação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros e ativação dos osteoblastos. (18) Por sua vez, a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inibe a secreção de PTH e previne a proliferação das glândulas paratiróides (42). Com um nível inadequado do produto cálcio-fosfato ocorre diminuição da mineralização óssea com consequências quer em crianças quer em adultos (43).

Em crianças, a deficiência de vitamina D clássica é denominada raquitismo, (20,31,32,33). A deficiência de vitamina D em adultos pode ser assintomática (deficiência leve) ou provocar osteomalacia ou mesmo osteoporose (deficiência moderada a grave). (20,31,32) Os músculos esqueléticos têm recetores VDR para a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , pelo que a sua deficiência também pode provocar fraqueza muscular. (31,33)

Vários estudos epidemiológicos, genéticos e nutricionais têm relacionado a deficiência de vitamina D com outras patologias, nomeadamente diversos cancros, doenças neurológicas, hipertensão arterial, doenças autoimunes (18,44) como DM1, artrite reumatóide ou esclerose múltipla, e doença cardíaca isquémica (31,33).

Já há muito tempo que se reconhece que as pessoas que vivem em altas latitudes, e portanto com menor exposição solar, enfrentam um maior risco de muitas doenças crónicas, como cancros comuns ou esclerose múltipla. (32)

Uma das mais intrigantes funções biológicas e pouco reconhecida da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  é a sua capacidade para regular negativamente o crescimento das células hiperproliferativas. As células normais e cancerosas com recetor da vitamina D geralmente respondem a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , diminuindo a sua proliferação e aumentando a sua maturação. (32) Tal facto pode explicar o papel protetor da vitamina D no cancro,

sustentado pela forte relação epidemiológica entre cancro da mama, próstata e cólon com a deficiência de vitamina D. (18)

Para além disso, também se verificou que existiam VDRs em linfócitos T e B e macrófagos ativados. (32) A vitamina D exerce uma ação inibitória na imunidade adaptativa, inibindo as células Th1 e favorecendo a resposta do tipo Th2.(45) As doenças autoimunes mais comuns, incluindo DM1, artrite reumatóide e esclerose múltipla, foram prevenidas com sucesso em modelos animais que receberam  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no início da vida. Quando ratos diabéticos não obesos, que geralmente desenvolvem diabetes tipo 1, receberam  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durante toda a sua vida, o seu risco de desenvolver DM 1 foi reduzido em 80% (32), resultados concordantes com o estudo de Hypponen *et al*, em que crianças que receberam 2000 UI de vitamina D a partir de 1 ano, apresentaram risco diminuído de contrair a doença também em 80%. (46)

Mesmo ao nível da DM2, foi demonstrada uma relação entre a deficiência de vitamina D e risco acrescido desta patologia. Estudos prospetivos verificaram que a suplementação com vitamina D e cálcio melhoram a tolerância à glicose por diminuição da resistência à insulina e aumento da secreção da mesma, diminuindo o risco de DM2. (5,14,23,24,47)

## B. DIABETES MELLITUS TIPO 1

A DM1 geralmente é diagnosticada antes dos 30 anos e tem o seu pico de incidência na puberdade (1,8,16,30). Raramente ocorre antes dos 6 meses de idade, aumenta acentuadamente a partir dos 9 meses até aos 12 a 14 anos, decrescendo a partir desta idade. (48) Estima-se que, até ao momento em que a DM1 é diagnosticada, 80-90% das células beta são perdidas. (1,8,21)

A doença é igualmente comum em homens e mulheres (49), mas existem estudos que afirmam que, para indivíduos diagnosticados após a puberdade, há um predomínio evidente no sexo masculino com uma proporção de 2 a 3:1. As razões para tal não são claras. (17)

O processo que conduz à destruição das células beta pode ser iniciada durante a infância precoce (21,50) ou mesmo antes do nascimento, pelo que o efeito dos determinantes ambientais quer no útero quer nos primeiros anos de vida podem ser de importância crucial para a sua instalação. (2) Os dados do estudo DIPP (*Type 1 Diabetes Prediction and Prevention*) mostraram que os anticorpos podem aparecer antes dos 3 meses, como marcador de indução do processo da doença. (17,50) Além disso, tem sido relatado recentemente que o aumento na incidência de DM1 entre as crianças dos países desenvolvidos é mais pronunciada em idades inferiores a 5 anos. Evidências apontam para o papel crítico de fatores exógenos no desenvolvimento de DM1, tais como: 1) o fato de <10% dos que apresentam suscetibilidade genética para a diabetes a venham a manifestar, 2) uma concordância de DM1 <40% entre os gêmeos monozigóticos, 3) um aumento marcado na incidência verificada nos últimos 50 anos em muitos países industrializados, e 4) estudos de migração que indicam que a incidência da doença aumenta nos grupos populacionais que se mudaram de uma região de menor incidência para uma região de alta incidência. (50)

Várias etapas na patogênese da DM1 sugerem que esta pode ser afetada pela nutrição. A idade de introdução de cereais (43,51), a exposição precoce ao leite de vaca, a ingestão de nitritos alimentares e nitrosaminas, o crescimento infantil rápido e o ganho de peso excessivo parecem aumentar o risco da doença. (4,11,17,21) Por outro lado, a ingestão de vitamina D, vitamina E e nicotinamida estão entre os poucos fatores nutricionais que têm sido sugeridos como tendo um papel protetor. (4,11) Vários fatores ambientais têm sido investigados como possíveis responsáveis pelo despoletar da resposta autoimune contra as células  $\beta$  pancreáticas, nomeadamente as infeções virais

(ex. enterovírus e rubéola) (11,15,21) ou a “hipótese da higiene” (a redução da exposição a infeções durante a infância como uma das causas responsáveis pelo aumento da atopia e da DM1 nos países desenvolvidos). (13)

Também as variações geográficas e sazonais foram relacionadas com a prevalência de DM1. Keen e Ekoe relataram que a DM1 é mais comum nas latitudes maiores dos trópicos e subtropicais.(45) Uma análise à incidência da DM1 na infância em 15 países, realizada em 1988, revelou que o gradiente de latitude explica 40% da variação do risco para a DM1. (13,49) Por exemplo, na Europa, um aumento de incidência foi observado com o aumento de latitude.(49) As taxas mais altas da doença foram encontradas nos meses de outono e inverno e menor durante os meses de verão. (19,45) A exposição à luz solar e a produção de vitamina D são mais elevadas no verão e menor durante o outono e inverno. (45) Este foi um dos fatores apontados como estando na origem desta variação mas existem outros em estudo, nomeadamente infeções virais, mais comuns no inverno, ou mesmo a dieta. (19) Além disso, uma variação sazonal entre a altura do parto e o desenvolvimento da DM1 foi encontrada, com a maior proporção de casos verificados em crianças nascidas durante a primavera e verão, no entanto os padrões observados não são consistentes entre os estudos. (19,49)

## I. Patogénese

A destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas característica desta doença é mediada quer por células T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ), quer por macrófagos, linfócitos B e células NK que se infiltram nos ilhéus pancreáticos, criando um processo inflamatório crónico – insulinite. (4,11)

A presença de auto-anticorpos contra as células  $\beta$ , que podem ser detetáveis antes do desenvolvimento da DM1, incluem auto-anticorpos contra as células  $\beta$  (ICA), anti-GAD65 (*glutamic acid decarboxylase*), IA-2A (*protein tyrosine phosphatase-like antibody*) e anti-insulina. (17) O número de auto-anticorpos detetáveis está inequivocamente relacionada com o risco de progressão para a DM1 clínica, em vários estudos de família e coortes da população em geral. Porém, a inexistência de auto-anticorpos não exclui completamente a presença de DM1. (52) Cerca de 90% dos indivíduos com DM1, recentemente diagnosticados, possui pelo menos 1 destes anticorpos. (53)



A apresentação de autoantígenos específicos das células  $\beta$  pelas células apresentadoras de antígenos (APC) a células Th0 em associação com moléculas MHC (complexo de histocompatibilidade major) de classe II, é considerado o processo inicial da doença. Os macrófagos e as células dendríticas secretam IL-12 que promove a diferenciação das células Th0 em Th1, estimulando-as a secretar IFN- $\gamma$  e IL-2. O IFN- $\gamma$ , por sua vez, estimula os macrófagos a libertar outras citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e radicais livres, tóxicos para as células  $\beta$  pancreáticas. Durante este processo, o IFN- $\gamma$  e IL-2 induzem a migração das células T citotóxicas CD8+, específicas contra os autoantígenos das células  $\beta$  (52) que, e em associação com moléculas de classe I, provocam a destruição das células  $\beta$ , através de apoptose mediada por Fas e da libertação de perforina e granzima. IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  vão exacerbar esta destruição celular. (7)

As células T NK, por sua vez, podem impedir a destruição das células  $\beta$  pancreáticas, através da secreção de IL-4, favorecendo a diferenciação das células Th0 em Th2. Este padrão de células Th2 liberta as citocinas IL-4 e IL-10 e inibe a secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$  pelas células Th1. (54)

Atualmente existe também evidência de associação entre o padrão Th17, uma linhagem de células T CD4<sup>+</sup> efectoras, distinta de Th1 e Th2, com a patogénese da DM1. (52)

A apresentação clínica da doença (caracterizada pelo aparecimento dos sintomas clássicos: polidipsia, poliúria e perda de peso) (14) é precedida por um período assintomático de duração variável. A destruição das células  $\beta$  pode ser agressiva, levando à manifestação da doença em alguns meses em crianças pequenas, enquanto que em outros o processo pode continuar por anos, em alguns casos superior a 10 anos. (17)

Não obstante os vários estudos existentes sobre a patogenia da DM1, o mecanismo exato que desencadeia e permite a progressão para a doença permanece desconhecido. Um fator de risco ambiental pode ser a deficiência de vitamina D. (7)

### C. VITAMINA D E DIABETES MELLITUS TIPO 1

O efeito da vitamina D no desenvolvimento da DM1 foi inicialmente testada usando ratos diabéticos não-obesos (NOD). (4)

A deficiência de vitamina D no início da vida ou a longo prazo resultam num início mais precoce, apresentação mais agressiva e maior incidência de DM1 em ratinhos NOD (55,56). Foi igualmente observado um aumento de citocinas pró-inflamatórias nos ilhéus pancreáticos, assim como uma diminuição de linfócitos CD4+ CD62L+, considerados como células reguladoras, no timo e nódulos linfáticos, dos ratinhos com deficiência de vitamina D. (56)

Em humanos, vários estudos observacionais têm revelado uma associação mundial entre a deficiência de vitamina D e a prevalência de DM1. Em cinco estudos, na Itália (57), Suécia (58), Norte da Índia (59), Grã Bretanha (60) e Austrália (61) crianças ou adultos jovens com DM1 recém-diagnosticados exibiam menores níveis de 25(OH)D relativamente a controlos saudáveis. Segundo os autores do estudo Sueco (58), os níveis baixos de 25(OH)D devem contribuir tanto para o desenvolvimento da DM1, como a própria DM1 pode também ela estar na origem de uma diminuição dos níveis de vitamina D, já que, no seguimento efetuado 8 anos após o diagnóstico os níveis mantinham-se baixos.

Um estudo suíço revelou uma tendência semelhante com 60,5% dos casos com deficiência de vitamina D entre 129 indivíduos com DM1 (36). Da mesma forma, um aumento da prevalência de deficiência de vitamina D em crianças e adolescentes com DM1 em comparação com indivíduos não-diabéticos foi observado em populações da Austrália (62), EUA (63), e Qatar (8). Os níveis de vitamina D reduziram significativamente em doentes com DM1, independentemente de apresentarem ou não complicações microvasculares, e foi encontrada uma correlação negativa entre estes níveis e biomarcadores de inflamação na DM1, incluindo PCR de alta sensibilidade, NF-JB mononuclear e expressão de receptores toll-like de monócitos. (64)

No entanto, existem resultados que contradizem esta associação: o estudo conduzido por Bierschenket *et al* (51) na Florida, EUA, não encontrou diferenças nos níveis de 25(OH)D entre indivíduos com DM1, familiares em 1º grau de diabéticos e controlos saudáveis, que se encontravam baixos em todos eles.

## I. Suplementos com Vitamina D ou análogos e a DM1

### a. Modelos animais

Um grande obstáculo à aplicação humana de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  é o desenvolvimento possível, como efeito colateral, de hipercalcemia, como resultado do aumento da reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  no intestino e osso. No entanto, tendo em vista o potencial terapêutico, os análogos estruturais foram sintetizados com o objetivo de alcançar uma dissociação entre os efeitos calcêmico e imunológico. Dos 2000 análogos sintetizados, (4) os mais promissores já foram testados com sucesso em ratinhos NOD. O mecanismo de proteção contra a insulinite e diabetes parece ser semelhante ao da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , com efetividade equivalente. (34)

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ou análogos não-hipercalcêmicos foram capazes de inibir o desenvolvimento de insulinite e prevenir o aparecimento de DM1 em ratinhos NOD (55,65,66,67). A incidência de insulinite nos ratinhos tratados foi reduzida de 75% para 41% no dia 100 (68); em ratos tratados, só 8% progrediram para doença manifesta no dia 200 em comparação com 56% no grupo de controle. (65) Outras observações em ratinhos NOD indicaram que a completa prevenção da DM1 pode ser conseguida utilizando doses suficientemente grandes de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Zella *et al* (55) verificou que nenhum dos ratinhos tratados com doses diárias de 50ng de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oral desenvolveram diabetes no dia 200.

Da mesma forma, o tratamento de ratinhos NOD.SCID (*non-obese diabetic. severe combined immunodeficiency*) com o análogo BXL-219 da vitamina D reduziu significativamente a infiltração das ilhotas com células T CD4+ e CD8+ recentemente transferidas de ratinhos NOD diabéticos (69).

A administração de KH1060 (70) ou TX527 (71) foi relatada como sendo igualmente eficaz na redução da incidência de diabetes. O efeito de ambos os análogos mostrou ser dependente da dose, e a proteção contra a diabetes foi obtida sem aumento dos níveis séricos de cálcio.

Tem sido sugerido que a prevenção da progressão para diabetes pode ser conseguida por análogos da vitamina D mesmo após o início do ataque autoimune. Numa experiência com o análogo MC1288 dado em combinação com a ciclosporina A após insulinite estabelecida verificou-se uma redução acentuada na incidência de diabetes. De realçar que nenhum destes tratamentos foi eficaz quando administrado isoladamente.

(72) Por outro lado, o análogo Ro 26-2198 (73), dado em monoterapia e em doses não hipercalcêmicas, bloqueou o curso da doença em ratinhos NOD com DM1 já estabelecida, inibiu a produção de IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$ , e de células Th1 e aumentou a frequência das células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nos nódulos linfáticos pancreáticos. O mesmo análogo foi utilizado em ratinhos BB (*BioBreeding*) mas apenas reduziu a incidência de DM1 de forma limitada. O facto deste análogo não ter estimulado as células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, como aconteceu nos ratinhos NOD, foi a explicação apresentada pelos autores. (74)

### **b. Modelos humanos**

Os estudos observacionais têm sugerido que a suplementação de vitamina D pode reduzir o risco de DM1, mas os resultados têm sido inconsistentes. (1) Os estudos em seres humanos incidiram sobre o papel da suplementação num estadio muito precoce (no útero ou durante a infância) ou após o diagnóstico de diabetes. (4)

O primeiro estudo sobre a associação entre a suplementação de vitamina D na infância e o risco de diabetes foi o EURODIAB (75) que combina os dados de sete países europeus. Este estudo caso-controlo multicêntrico sugeriu uma redução de 33% no risco de vir a desenvolver DM1 se as crianças recebessem suplementação com vitamina D, sem especificação da dose, durante o primeiro ano de vida, mesmo depois de ajustado para possíveis fatores confundidores (baixo peso ao nascer, curta duração do aleitamento materno, idade materna avançada e centro de estudo na análise de regressão logística).

Outros estudos demonstraram resultados semelhantes a este, nomeadamente um estudo coorte finlandês (46) e um estudo caso-controlo (9) que evidenciaram o papel da vitamina D durante o 1º ano de vida e o desenvolvimento de DM1. Além disso, foi encontrado um efeito dose-resposta, com as crianças que receberam a suplementação de vitamina D com regularidade e em dose  $\geq 2000$ UI, a apresentarem uma redução do risco de desenvolver DM1 superior a 80%. (46) Uma meta-análise de quatro estudos caso-controle e um estudo de coorte, evidenciou que o risco de DM1 foi significativamente reduzido (~29%) em crianças que foram suplementadas com vitamina D, comparativamente ao grupo controlo. Houve igualmente alguma evidência de um efeito dose-resposta, com aqueles que utilizaram quantidades mais elevadas de vitamina D a apresentarem menor risco de desenvolver DM1, e a sugestão de que a temporização

da suplementação poderá ser importante para o subsequente desenvolvimento da doença. (1)

Conclusões diferentes tiveram 2 estudos realizados por Stene *et al.* Estes compararam a suplementação com vitamina D por ingestão de óleo de fígado de bacalhau ou suplementos com vitamina D, tanto por mulheres grávidas, como por crianças durante o 1º ano de vida, e o risco de desenvolvimento de DM1 pelas crianças. No primeiro, Stene *et al* (2000) (76) concluíram que apenas existiu associação entre a ingestão de óleo de fígado de bacalhau pelas mulheres grávidas e uma diminuição do risco de DM1 nos descendentes. No estudo seguinte, com maior amostra, Stene *et al* (2003) (77) concluíram que existiu associação entre a ingestão de óleo de fígado de bacalhau pelas crianças durante o 1º ano de vida e uma diminuição do risco de desenvolvimento de DM1. A razão para estes resultados é desconhecida pelos próprios autores, que justificaram os melhores resultados com óleo de fígado de bacalhau relativamente a outros suplementos pela possível maior biodisponibilidade de vitamina D, ou pela associação com outro dos constituintes do óleo de fígado de bacalhau (ácidos gordos omega-3 ou vitamina A), com a diminuição do risco de desenvolvimento da DM1. (76) A força deste estudo é, no entanto, comprometida pela falta de informação sobre a dose de todos os suplementos usados, de modo que não é possível excluir a hipótese de que os indivíduos tenham sido sujeitos a doses mais baixas relativamente ao estudo finlandês supracitado. (19)

No que diz respeito ao desenvolvimento de auto-anticorpos contra as ilhotas e à suplementação com vitamina D existem igualmente estudos contraditórios. Apesar do estudo DAISY (*Diabetes Auto-immunity Study in the Young*) estabelecer uma relação entre a suplementação durante a gravidez e a diminuição do risco de aparecimento de auto-anticorpos anti-insulina, IA-2A e anti-GAD<sub>65</sub> em crianças com risco aumentado (78), outros estudos não encontraram associação entre a ingestão materna de vitamina D durante a gravidez e a presença de auto-anticorpos (2), tal como outros (79,80) não encontraram nenhuma associação entre a suplementação com vitamina D durante a infância e o desenvolvimento de auto-anticorpos. Miettinen *et al* não descobriram relação entre as concentrações séricas de 25(OH)D no 1º trimestre de gravidez e a presença de auto-anticorpos. (81) Devem, contudo, sobressair-se algumas lacunas dos estudos supracitados, como pequena amostra, doses de vitamina D ingeridas relativamente baixas ou não determinação dos níveis séricos de vitamina D.

Um estudo Norueguês recente (82) obteve resultados que indicam uma relação entre baixas concentrações séricas maternas de 25(OH)D durante a gravidez e aumento do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 1 na infância.

Alguns estudos foram também realizados após o diagnóstico de DM1 com o objetivo de investigar se a vitamina D teria efeito protetor na função residual das células  $\beta$ . A suplementação com vitamina D melhorou o controlo glicémico (analisada pelos níveis de HbA1c) em doentes com DM1 que apresentavam défice de vitamina D, num estudo realizado na Arábia Saudita (83). Outro estudo investigou o efeito da administração de calcitriol (em comparação com a nicotinamida) em crianças com diabetes recém-diagnosticado, observando que pareciam existir alguns benefícios a curto prazo com o tratamento com calcitriol (0.25 $\mu$ g em dias alternados), em comparação com a nicotinamida, sobre a dose de insulina necessária aos 3 e 6 meses. No entanto, as concentrações de peptídeo C ou HbA1c (refletindo a secreção de insulina residual e a homeostasia da glicose) não diferiram entre os grupos de calcitriol e nicotinamida em 1 ano, indicando que os benefícios a longo prazo da suplementação de calcitriol iniciado após o diagnóstico de diabetes seriam, provavelmente, limitados. (84) Resultados semelhantes foram igualmente obtidos noutros estudos, que sugeriram, assim, que os efeitos protetores da vitamina D pudessem ser benéficos na modulação inicial do processo autoimune, mas não após o estabelecimento da doença. (85,86)

No geral, os resultados existentes sobre a suplementação com vitamina D em humanos com DM1 pode ser sujeita a alguma incerteza, uma vez que muitos são estudos retrospectivos baseados em questionários envolvendo amostras de pequenas dimensões e, em vários casos, de baixas doses de vitamina D. Além disso, nem sempre os níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> e outros metabolitos da vitamina D foram determinados.

## **II. Imunomodulação da Vitamina D**

As ações imunomodeladoras e anti-inflamatórias da vitamina D poderão reduzir a reação inflamatória nos ilhéus pancreáticos e diminuir a insulinite característica da DM1, modulando assim a patogénese desta doença. (24)

In vitro, a 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> estimula a fagocitose e a morte de bactérias por macrófagos,(49) mas inibe a função “apresentadora de antigénios” destas células e das células dendríticas, sobre as quais recaem a maioria dos estudos. Tem, igualmente, a capacidade de inibir a produção de IL-12 (crítica para o desenvolvimento de células Th1),

secretada pelas células dendríticas, assim como a capacidade de inibir a sua maturação e diferenciação, crucial na indução de resposta imune mediada por células T. (23) Também foi demonstrado que o tratamento com  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  suprime a expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86, (54) assim como do MHC-II à superfície (49), para além de aumentar a produção de IL-10 (54).

A vitamina D também pode atuar diretamente nas células T e B: os agonistas VDR inibem seletivamente o desenvolvimento de células Th1, assim como de citocinas secretadas por estas, como a IL2 e o IFN- $\gamma$ . (23) Estas citocinas são conhecidas por ativar macrófagos e células T citotóxicas, com capacidade para danificar tecidos alvo, nas quais se incluem as células beta pancreáticas. (87) Também foi demonstrada a sua capacidade de estimular o desenvolvimento de células Th2 através de um efeito direto nas células CD4+. Os linfócitos B também possuem VDR e são capazes de sintetizar vitamina D. A  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  exerce um efeito direto nestas células, estando envolvida na indução da sua apoptose e inibição da sua proliferação, geração de células B de memória, diferenciação em plasmócitos e produção de imunoglobulinas. (54)

Tomadas em conjunto, estas observações sugerem um papel fisiológico da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  no sistema imunitário, com, por um lado, uma secreção firmemente regulada da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  por macrófagos com a estimulação imunitária, e, por outro, um efeito inibitório através da sua ação nas células apresentadoras de antígeno, células T e B e alteração da secreção de citocinas. Estes efeitos imunes são tipicamente mediados pelo VDR. (23)

### III. Genética, Vitamina D e DM1

Vários autores têm investigado a contribuição de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo e ação da vitamina D para o risco de desenvolvimento da DM1, mais precisamente dos genes codificadores do recetor da vitamina D, das enzimas envolvidas no seu metabolismo e da proteína de ligação da vitamina D.

Dos fatores genéticos possíveis de intervirem no desenvolvimento de DM1, os genes do MHC, particularmente o HLA-II (antígenos de leucócitos humanos de classe II), possuem cerca de 40-50% do total da componente hereditária desta doença. (88) Dos haplótipos HLA, o DR4-DQ8 e o DR3-DQ2 estão presentes em cerca de 90% das crianças com DM1, sendo que a combinação dos dois (DR4-DQ8/DR3-DQ2) confere uma suscetibilidade aumentada, contribuindo para o maior risco de doença e desenvolvimento

mais precoce desta. Outros genes com risco inferior foram identificados, como o PTPN22 (gene da insulina que codifica a proteína tirosina fosfatase) ou o CTLA4 e o CD25 (implicados na imunomodulação), apesar de não serem suficientes nem necessários para despoletar a DM1. (89)

#### **a. Recetor da Vitamina D**

A vitamina D e os seus análogos exercem as suas ações através da sua ligação ao VDR. O gene VDR, localizado no cromossoma (cr)12q12-q14, tem pelo menos cinco regiões promotoras, 8 exões codificadores de proteínas e seis exões não traduzidos, de splicing alternativo. FokI (no exão 2), BsmI e Apal (ambos no intrão 8) e TaqI (no exão 9) são os quatro polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) mais comumente investigados do gene VDR. (88) Os genótipos do gene VDR foram determinados de acordo com a presença ou ausência de locais de restrição polimórficos (90) e designados por uma letra maiúscula (alelos "F", "B", "A" ou "T"), na presença do local de restrição, ou minúscula (alelos "f", "b", "a" ou "t"), na ausência do mesmo. (91)

O primeiro relato de uma associação entre DM1 e polimorfismo VDR foi efetuada por McDermott *et al* (92), em 1997. Eles relataram que o alelo " b" do polimorfismo BsmI foi preferencialmente transmitida para os indivíduos com DM1.

Ban *et al*, (93) realizaram um estudo em indivíduos japoneses, que revelou que o alelo "F", assim como o genótipo "FF" do polimorfismo FokI, eram significativamente mais comuns nos doentes com DM1 relativamente aos controlos, atribuindo a este genótipo suscetibilidade aumentada para a DM1. Por outro lado, um estudo que incidiu sobre indivíduos iranianos (16) demonstrou que o genótipo TT e o alelo T do polimorfismo TaqI eram mais frequentes em indivíduos saudáveis em comparação com indivíduos com DM1, concluindo assim que o alelo t era um alelo de risco para o desenvolvimento de DM1. Outros estudos realizados em populações de países como Taiwan (10), Chile (91) Alemanha (94,95), Japão (96), Espanha (97,98) ou Grécia (99) apresentaram associações semelhantes entre os polimorfismos FokI, BsmI, Apal e TaqI e a DM1.

Não obstante, estudos contraditórios têm surgido nesta matéria. Um estudo envolvendo mais de 3.000 famílias com DM1 da Finlândia, Reino Unido, Noruega, Roménia e EUA não encontrou nenhuma evidência entre a associação de DM1 com qualquer um dos quatro SNPs acima mencionados. (100) Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados na Hungria (101), Finlândia (102), Portugal (103), Brasil (104) e Austrália (105).



Guo *et al* (88), numa meta-análise que incluiu 19 estudos que relacionavam 4 polimorfismos do VDR (FokI, BsmI, ApaI e TaqI) com a DM1, não encontraram evidência de associação entre estas variáveis, com exceção do FokI, onde foi encontrada uma pequena associação.

Uma outra meta análise realizada por Ponsonby *et al* (106) reviu 16 casos-controlo sobre polimorfismos selecionados do VDR, e concluiu que a variação sazonal dos níveis de radiação ultravioleta (UVR) ambiental pode influenciar a associação entre o genótipo VDR e o risco de desenvolver DM1. Observou-se que para os loci FokI e BsmI (alelos F e B, respetivamente), o risco de DM1 aumentou com os níveis ambientais de UVR no inverno.

Diferenças etnias relacionadas com a distribuição dos polimorfismos do VDR ou interações com outros fatores genéticos e ambientais foram sugeridos para explicar os dados contraditórios dos diferentes estudos. Uma meta-análise recente que integrou um total de 57 estudos caso-controle demonstrou que o genótipo variante (Bb + BB) do polimorfismo BsmI está associado a um aumento significativo do risco para o desenvolvimento de DM1, enquanto que os polimorfismos FokI, ApaI e TaqI não pareceram ter uma associação significativa com o risco global DM1. Na análise por etnia, esta meta-análise apontou o polimorfismo BsmI como estando associado a um aumento do risco de DM1 em populações asiáticas, sem no entanto nenhuma associação significativa ter sido encontrada em populações europeias. (3)

Apesar da inconsistência de resultados no que diz respeito à associação entre os polimorfismos do gene VDR e a DM1, esta hipótese não foi afastada por completo, uma vez que não existem estudos para a maioria dos SNPs já identificados neste gene. (103)

Mais recentemente, num estudo efetuado na população DAISY (107), uma variante funcional do VDR, VDR rs2228570, foi significativamente associada à progressão para DM1 em crianças numa fase pré-clínica da doença em que já existem anticorpos circulantes contra as ilhotas pancreáticas.

## **b. Enzimas metabolizadoras da vitamina D**

Os polimorfismos envolvendo enzimas do metabolismo da vitamina D, nomeadamente a CYP27B1, CYP24A1 e CYP2R1, foram igualmente estudados para estabelecer o seu papel na patogénese da DM1.

O gene CYP27B1, localizado no cr12q.13.1-13.3, e os seus polimorfismos -1260 C>A (rs10877012), localizado na região promotora, e +2838 C>T (rs4646536), localizado no intrão 6, foram alvo de vários estudos. Bailey *et al* encontraram associação entre o polimorfismo CYP27B1 -1260 C>A e a DM1. Segundo estes autores, o alelo “C” conferia uma maior suscetibilidade para a doença. (108) Num estudo alemão (109), não foi encontrada evidência de associação entre o polimorfismo CYP27B1 +2838 C>T e a DM1. No entanto, outro estudo (108) que envolveu indivíduos de vários países da europa encontrou esta associação, atribuindo ao alelo “T” um risco acrescido de desenvolver DM1.

Relativamente ao gene CYP24A1, localizado no cr20q13.2-q13.3, 16 SNPs foram estudadas também por Bailey *et al*, não tendo sido encontrada qualquer associação com a DM1. (108)

O gene CYP2R1, localizado no cr11p15.2, contém cinco exões. Ramos-Lopez *et al* (110), conduziram uma investigação sobre dois polimorfismos deste gene, rs12794714 e rs10741657, encontrando somente para o último uma associação com a DM1. De acordo com os seus resultados, o alelo “G” apresentava maior frequência nos doentes diabéticos, sendo que os genótipos “GG” e “GA” estavam associados a níveis menores de 25(OH)D<sub>3</sub>.

### **c. Proteína de ligação da vitamina D**

A DBP (ou *Group-specific component* – Gc) (111) é a principal transportadora da vitamina D e seus metabolitos no plasma e é essencial para a sua endocitose celular. Os níveis plasmáticos de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> estão relacionados com os níveis de DBP. (112) Para além da sua função principal relacionada com a vitamina D, foi demonstrado que a DBP pode ativar os macrófagos, estimular os osteoclastos e aumentar a atividade quimiotática de C5, podendo igualmente ser encontrada na superfície de células do sistema imunológico, tais como linfócitos T e B. (111) O gene DBP, localizado no cr4q12-q13, contém três polimorfismos usados em vários estudos: o polimorfismo (TAAA)<sub>n</sub>, localizado no intrão 8; o polimorfismo Haelll, localizado no exão 11, com substituição T→G e que condiciona a troca de um aminoácido aspartato pelo glutamato; e o polimorfismo Styl, localizado no exão 11, com alteração C→G e que condiciona a substituição de um aminoácido treonina pela lisina. (111,112). Essas variantes da DBP poderão ser responsáveis pelas diferenças na afinidade pela 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. (112)

Ongagna *et al* (112) verificaram a existência de associação entre o polimorfismo HaeIII do gene DBP e a DM1, encontrando um aumento significativo do alelo “Glu” assim como do genótipo “Glu/Glu” em indivíduos com DM1. Encontraram, ainda, uma relação direta entre este alelo e um marcador de autoimunidade, o IA-2A. No entanto, Pani *et al* (113) não encontraram qualquer relação entre os 3 polimorfismos acima referidos do gene DBP e o desenvolvimento de DM1, deixando o mecanismo pela qual a DBP pode afetar esta patologia aberta a novos estudos.

## CONCLUSÃO:

A presença de VDR em vários tipos celulares fez com que as ações da vitamina D se estendessem para lá da homeostasia cálcio-fósforo e a relacionassem com diversos cânceros, doenças hipertensivas e cardiovasculares, do sistema nervoso e autoimunes, na qual se inclui a DM1.

A DM1 parece ser uma patologia com incidência mundial crescente e apesar de vários fatores genéticos e ambientais contribuírem para o seu desenvolvimento, os mecanismos nela envolvidos permanecem em investigação.

Diversos estudos realizados apontam para uma diminuição dos níveis de vitamina D em indivíduos com DM1. Da mesma forma, a suplementação com vitamina D sugere um papel protetor contra o desenvolvimento de DM1. Quer a sua ação imunomoduladora quer diversos polimorfismos genéticos parecem influenciar esta relação, com associações já descritas entre o risco de DM1 e polimorfismos dos genes que codificam: o recetor da vitamina D, a proteína de ligação da vitamina D e certas enzimas envolvidas no seu metabolismo, nomeadamente a CYP27B1 e a CYP2R1.

No entanto, existem dados discordantes entre os diferentes estudos, sendo necessária mais investigação nesta área de forma a que: o papel da vitamina D nesta doença seja mais claramente compreendido; as variações geográficas ou populacionais intervenientes nesta relação sejam determinadas; os valores a partir do qual a vitamina D é benéfica sejam identificados; o *timing* ideal para a suplementação com vitamina D seja estabelecido e os fatores de suscetibilidade genética para a DM1 sejam apontados. Tal será essencial para que estratégias preventivas e terapêuticas possam ser estudadas e implementadas, combatendo as tendências crescentes da incidência desta doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Zipitis CS, Akobeng AK (2008) *Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Arch Dis Child* 93: 512-517
2. Marjamäki L, Niinistö S, Kenward MG, Uusitalo L, Uusitalo U, Ovaskainen ML, et al. (2010) *Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of advanced beta cell autoimmunity and type 1 diabetes in offspring, Diabetologia* 53: 1599-1607.
3. Zhang J, Li W, Liu J, Wu W, Ouyang H, Zhang Q, et al. (2012) *Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: An update by meta-analysis. Molecular and Cellular Endocrinology* 355: 135–142
4. Hyppönen E (2004) *Micronutrients and the Risk of Type 1 Diabetes: Vitamin D, Vitamin E, and Nicotinamide. Nutrition Reviews* 62: 340–347
5. Holick MF (2008) *Diabetes and the Vitamin D Connection. Current Diabetes Reports* 8: 393–398
6. 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
7. Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C (2011) *Vitamin D and diabetes: Its importance for beta cell and immune function. Molecular and Cellular Endocrinology* 347: 106–120
8. Bener A, Alsaied A, Al-Ali M, Al-Kubaisi A, Basha B, Abraham A, et al., (2009) *High prevalence of vitamin D deficiency in type 1 diabetes mellitus and healthy children. Acta Diabetol.* 46: 183–189.
9. Ahadi M, Tabatabaeiyan M, Moazzami K (2011) *Association between environmental factors and risk of type 1 diabetes — a case-control study. Pol J Endocrinol* 62: 134–137
10. Chang T-J, Lei H-H, Yeh J-I, Chiu KC, Lee K-C, Chen M-C, et al. (2000) *Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. Clinical Endocrinology* 52: 575–580

11. Åkerblom HK, Vaarala O, Hyöty H, Ilonen J, Knip M (2002) *Environmental Factors in the Etiology of Type 1 Diabetes. American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.)* 115: 18–29
12. Mohr SB, Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Ricordi C (2010) *Is There a Role of Vitamin D Deficiency in Type 1 Diabetes of Children? Am J Prev Med* 39: 189–190
13. Merriman TR (2009) *Type 1 diabetes, the A1 milk hypothesis and vitamin D deficiency. Diabetes Research and Clinical Practice* 83: 149–156
14. Boucher BJ (2011) *Vitamin D Insufficiency and Diabetes Risks. Current Drug Targets* 12: 61-87
15. Jankosky C, Deussingb E, Gibsonc RL, Haverkos HW (2012) *Viruses and vitamin D in the etiology of type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. Virus Research* 163: 424– 430
16. Mohammadnejad Z, Ghanbari M, Ganjali R, Afshari JT, Heydarpour M, Taghavi SM, et al. (2012) *Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus in Iranian population. Mol Biol Rep* 39: 831–837
17. Virtanen SM, Knip M (2003) *Nutritional risk predictors of  $\beta$  cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. Am J Clin Nutr* 78: 1053–67
18. Ginanjar E, Sumariyono, Setiati S, Setiyohadi B (2007) *Vitamin D and Autoimmune Disease. Acta Med Indones-Indones J Intern Med* 39: 133-140
19. Hyppönen E (2010) *Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes- evidence for an association? Diabetes, Obesity and Metabolism* 12: 737–743
20. Penckofer S, Kouba J, Wallis DE, Emanuele MA (2008) *Vitamin D and Diabetes Let the Sunshine In. Diabetes Educ.* 34: 939-953
21. Baba KE, Zantout MS, Akel R, Azar ST (2011) *Seasonal variation of vitamin D and HbA1c levels in patients with type 1 diabetes mellitus in the Middle East. International Journal of General Medicine* 4: 635–638
22. Monteiro, T. (2009). *Carência de vitamina D: um problema de saúde pública não reconhecido e frequente no Grande Porto? Acta Pediatr Port* 40(2):49-52

23. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R (2005) *Vitamin D and diabetes. Diabetologia* 48: 1247–1257
24. Danescu LG, Levy S, Levy J (2009) *Vitamin D and diabetes mellitus. Endocr* 35: 11-17
25. Harris S (2002) *Can Vitamin D Supplementation in Infancy Prevent Type 1 Diabetes? Nutrition Reviews* 60: 118-121
26. Cantorna MT, Mahon BD (2004) *Mounting Evidence for Vitamin D as an Environmental Factor Affecting Autoimmune Disease Prevalence. Experimental Biology and Medicine* 229: 1136-1142
27. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H, Burren OS, Wallace C, et al. (2011) *Inherited Variation in Vitamin D Genes Is Associated With Predisposition to Autoimmune Disease Type 1 Diabetes. Diabetes* 60: 1624-1631
28. Zella JB, DeLuca HF (2003) *Vitamin D and Autoimmune Diabetes. Journal of Cellular Biochemistry* 88: 216–222
29. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M (2008) *Vitamin D Deficiency in Children and Its Management: Review of Current Knowledge and Recommendations. Pediatrics* 122; 398-417.
30. Harris SS (2005) *Vitamin D in Type 1 Diabetes Prevention. American Society for Nutritional Sciences* 323-325
31. Tai K, Need AG, Horowitz M, Chapman IM (2008) *Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. Nutrition* 24: 279–285
32. Holick MF (2004) *Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. Am J Clin Nutr* 79: 362–71
33. Holick MF (2004) *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr* 80(suppl): 1678S–88S
34. Mathieu C, Badenhoop K (2005) *Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 16: 261-266

35. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. (2008) *Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. Endocrine Reviews* 29:726–776
36. Janner, M., Ballinari, P., Mullis, P.E., Fluck, C.E., (2010) *High prevalence of vitamin D deficiency in children and adolescents with type 1 diabetes. Swiss. Med. Wkly.* 140: w13091
37. Miettinen ME, Reinert L, Kinnunen L, Harjutsalo V, Koskela P, Surcel H-M, et al. (2012) *Serum 25-hydroxyvitamin D level during early pregnancy and type 1 diabetes risk in the offspring. Diabetologia – Short communication*
38. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK et al. (2011) *The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 96: 53–58
39. Chakhtoura M, Azar ST (2013) *The Role of Vitamin D Deficiency in the Incidence, Progression, and Complications of Type 1 Diabetes Mellitus.* 2013
40. Heaney RP (2008) *Vitamin D in Health and Disease. Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1535–1541
41. Holick MF (2008) *Vitamin D: a D-Lightful health perspective. Nutr Rev.* 66: S182-94.
42. Bikle D (2009). *Nonclassic Actions of Vitamin D. J Clin Endocrinol Metab* 94: 26-34
43. Holick MF (2007). *Vitamin D Deficiency. N Eng J Med* 357: 266-81
44. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R (2005) *Noncalcemic Actions of Vitamin D Receptor Ligands. Endocrine Reviews* 26: 662–687
45. Luong KVQ, Nguyen LTH, Nguyen DNP (2005) *The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus. Diabetes Metab Res Rev* 21: 338–346
46. Hypponen E, Laara E, Jarvelin M-R, Virtanen SM. (2001) *Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. Lancet* 358:1500–1503
47. Pittas AG, Dawson-Hughes B (2010) *Vitamin D and Diabetes. J Steroid Biochem Mol Biol.* 121: 425–429



48. Adegate E, Schattner S, Dunn E. (2006) *An Update on the Etiology and Epidemiology of Diabetes Mellitus. Ann N Y Acad Sci.* 1084: 1–29.
49. Ponsonby AL, Lucas RM, I. Mei AF (2005) *UVR, Vitamin D and Three Autoimmune Diseases—Multiple Sclerosis, Type 1 Diabetes, Rheumatoid Arthritis. Photochemistry and Photobiology* 81: 1267–1275
50. Knip M, Virtanen SM, Akerblom HK (2010) *Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. Am J Clin Nutr* 91(suppl):1506S–13S
51. Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C, Haller M, Schatz D, Atkinson M (2009) *Vitamin D Levels in Subjects With and Without Type 1 Diabetes Residing in a Solar Rich Environment. Diabetes Care* 32: 1977–1979
52. Ichinose K, Kawasaki E, Eguchi K. (2007) *Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. Am J Nephrol.* 27: 554-64.
53. Gillespie KM. (2006) *Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. CMAJ.* 175: 165-70.
54. Adorini L, Penna G. (2008) *Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. Nat Clin Pract Rheumatol.* 4: 404-12
55. Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. (2003) *Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. Arch Biochem Biophys.* 417:77– 80.
56. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, Van EE, Decallonne B, Overbergh L, et al. (2004) *Vitamin D deficiency in early life accelerates type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. Diabetologia* 47: 451–462
57. Pozzilli P, Manfrini S, Crino A, Picardi A, Leomanni C, Cherubini V, et al. (2005) *Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. Horm. Metab. Res.* 37: 680–683
58. Littorin B, Blom P, Scholin A, Arnqvist HJ, Blohme G, Bolinder J, et al. (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

59. Borkar VV, Devidayal, Verma S, Bhalla AK (2010) Low levels of vitamin D in North Indian children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* 11: 345–350.
60. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H, Burren OS, Wallace C, et al. (2011) Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes* 60: 1624–1631
61. Greer RM, Portelli SL, Hung BS, Cleghorn GJ, McMahon SK, Batch JA, et al. (2013) Serum vitamin D levels are lower in Australian children and adolescents with type 1 diabetes than in children without diabetes. *Pediatr Diabetes*. 14(1):31-41
62. Greer RM, Rogers MA, Bowling FG, Buntain HM, Harris M, Leong GM, et al. (2007) Australian children and adolescents with type 1 diabetes have low vitamin D levels. *Med. J. Aust.* 187: 59–60
63. Svoren BM, Volkening LK, Wood JR, Laffel LM (2009) Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus. *J. Pediatr.* 154: 132–134
64. Devaraj S, Yun JM, Duncan-Staley CR, Jialal I (2011) Low vitamin D levels correlate with the proinflammatory state in type 1 diabetic subjects with and without microvascular complications. *Am. J. Clin. Pathol.* 135: 429–433
65. Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouil-lon R (1994) Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Diabetologia* 37: 552–558
66. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L (2002) A 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51: 1367–1374
67. Driver JP, Foreman O, Mathieu C, Van EE, Serreze DV (2007) Comparative therapeutic effects of orally administered 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on type-1 diabetes in non-obese diabetic mice fed a normal-calcaemic diet. *Clin. Exp. Immunol.* 151: 76–85
68. Mathieu C, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R. (1992) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 41: 1491–1495
69. Giarratana N, Penna G, Amuchastegui S, Mariani R, Daniel KC, Adorini L (2004) A vitamin D analog down-regulates proinflammatory chemokine production by pancreatic

*islets inhibiting T cell recruitment and type 1 diabetes development. J. Immunol. 173: 2280–2287*

70. Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R (1995) Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, KH1060. *Endocrinology* 136: 866–872

71. Van Etten E, Decallonne B, Verlinden L, Verstuyf A, Bouillon R, Mathieu C (2003) Analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as pluripotent immunomodulators. *J Cell Biochem* 88: 223–226

72. Casteels KM, Mathieu C, Waer M, Valckx D, Overbergh L, Laureys JM, et al. (1998) Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by late intervention with nonhypercalcemic analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in combination with a short induction course of cyclosporin A. *Endocrinology*. 139: 95-102

73. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. (2002) A 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51: 1367–74

74. Pedullà M, Desiderio V, Graziano A, d'Aquino R, Puca A, Papaccio G (2007) Effects of a vitamin D<sub>3</sub> analog on diabetes in the bio breeding (BB) rat. *JCell Biochem*. 100: 808-14

75. The EURODIAB Substudy 2 Study Group.(1999) Vitamin D supplement in early childhood and risk for type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 42: 51–4

76. Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G (2000) Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring. *Diabetologia*. 43: 1093-8

77. Stene LC, Joner G (2003) Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *Am J Clin Nutr* 78: 1128-34

78. Fronczak CM, Baron AE, Chase HP, Ross C, Brady HL, Hoffman M, et al. (2003) In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes Care* 26: 3237–3242

79. Brekke HK, Ludvigsson J (2007) Vitamin D supplementation and diabetes-related autoimmunity in the ABIS study. *Pediatr. Diabetes* 8: 11–14

80. Simpson M, Brady H, Yin X, Seifert J, Barriga K, Hoffman M, et al. (2011) No association of vitamin D intake or 25-hydroxyvitamin D levels in childhood with risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetologia* 54: 2779–2788
81. Miettinen ME, Reinert L, Kinnunen L, Harjutsalo V, Koskela P, Surcel H-M et al. (2011) Serum 25-hydroxyvitamin D level during early pregnancy and type 1 diabetes risk in the offspring. *Diabetologia - Short Communication*
82. Sørensen IM, Joner G, Jenum PA, Eskild A, Torjesen PA, Stene LC (2012) Maternal Serum Levels of 25-Hydroxy-Vitamin D During Pregnancy and Risk of Type 1 Diabetes in the Offspring. *Diabetes* 61: 175-178
83. Aljabri KS, Bokhari SA, Khan MJ (2010) Glycemic changes after vitamin D supplementation in patients with type 1 diabetes mellitus and vitamin D deficiency. *Ann Saudi Med.* 30: 454–458
84. Pitocco D, Crino A, Di Stasio E, Manfrini S, Guglielmi C, Spera S, et al. (2006) The effects of calcitriol and nicotinamide on residual pancreatic beta-cell function in patients with recent-onset type 1 diabetes (IMDIAB XI). *Diabet Med* 23: 920–923
85. Bizzarri C, Pitocco D, Napoli N, Stasio E, Maggi D, Manfrini S, et al. (2010) No Protective Effect of Calcitriol on-Cell Function in Recent-Onset Type 1 Diabetes (The IMDIAB XIII trial). *Diabetes Care* 33: 1962–1963
86. Walter M, Kaupper T, Adler K, Foersch J, Bonifacio E, Ziegler A-G (2010) No Effect of the 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on  $\beta$ -Cell Residual Function and Insulin Requirement in Adults With New-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 33: 1443–1448
87. Vieth R, Chan PC, MacFarlane GD. (2001) Efficacy and safety of vitamin D<sub>3</sub> intake exceeding the lowest observed adverse effect level. *Am J Clin Nutr.* 73: 288-94
88. Guo SW, 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: 711-24
89. Gillespie KM. (2006) Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ.* 175: 165-70

90. Boraska V, Skrabić V, Zeggini E, Groves CJ, Buljubasić M, Peruzović M, et al. (2008) Family-based analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes in the population of South Croatia. *J Hum Genet.* 53: 210-4
91. Garcia D, Angel B, Carrasco E, Albala C, Santos JL, Pérez-Bravo F. (2007) VDR polymorphisms influence the immune response in type1 diabetic children from Santiago, Chile. *Diabetes Res Clin Pract.* 77: 134-40
92. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, et al. (1997) Allelic variation in the vitaminD receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia.* 40: 971–5.
93. Ban Y, Taniyama M, Yanagawa T, Yamada S, Maruyama T, Kasuga A et al. (2001) Vitamin D receptor initiation codon polymorphism influences genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Japanese population. *BMC Med Genet.* 2:7
94. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, et al. (2000) Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 49: 504-507
95. Ramos-Lopez E, Jansen T, Ivaskevicius V, Kahles H, Klepzig C, Oldenburg J, et al. (2006) Protection from type 1 diabetes by vitamin D receptor haplotypes. *Ann NY Acad Sci* 1079: 327-334
96. Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M, et al. (2003) Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3137-3140
97. Audi L, Marti G, Esteban C, Oyarzabal M, ChuecaM, Gussinyé M, et al. (2004) VDR gene polymorphism at exon 2 start codon (Fok I) may have influenced type 1 diabetes mellitus susceptibility in two Spanish populations. *Diabet Med.* 21: 393–4
98. San-Pedro JI, Bilbao JR, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Martul P, Castaño L. (2005) Heterogeneity of vitamin D receptor gene association with celiac disease and type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity.* 38: 439–44
99. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E (2009) Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clinical Immunology* 133: 276–281

100. Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, Howson JM, Rance H, Nutland S, et al. (2004) Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes* 53: 2709–2712
101. Gyorffy B, Vasarhelyi B, Krikovszky D, Madácsy L, Tordai A, Tulassay T, et al. (2002) Gender specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology* 147: 803–808
102. Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine AP, Simell O, Knip M, et al. (2003) Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *Eur J Endocrinol.* 149: 591–596
103. Lemos MC, Fagulha A, Coutinho E, Gomes L, Bastos M, Barros L, et al. (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
104. Mory DB, Rocco EÂR, Miranda WL, Kasamatsu T, Crispim F, Dib SA (2009) Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to  $\beta$ -cell autoimmunity and to remaining  $\beta$ -cell function. *Human Immunology* 70: 447-451
105. Kahles H, Morahan G, Todd JA, Badenhoop K (2009) Association analyses of the vitamin D receptor gene in 1654 families with type I diabetes. *Genes Immun.* 10(Suppl 1): S60–S63
106. Ponsonby, A.L., Pezic, A., Ellis, J., Morley R, Cameron F, Carlin J, et al. (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
107. Frederiksen B, Liu E, Romanos J, Steck AK, Yin X, Kroehl M, et al. (2013) Investigation of the vitamin D receptor gene (VDR) and its interaction with protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 gene (PTPN2) on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 133:51-7
108. Bailey R, Cooper J, Zeitels L, Smyth D, Yang JH, Walker NM, et al. (2007) Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes.* 56: 2616-2621.

109. Pani MA, Regulla K, Segni M, Krause M, Hofmann S, Hufner M, et al. (2002) Vitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP1 $\alpha$ ) polymorphism in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 146: 777-781
110. Ramos-Lopez E, Brück P, Jansen T, Herwig J, Badenhop K. (2007) CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes Metab Res Rev.* 23: 631-636
111. Blanton D, Han Z, Bierschenk L, Linga-Reddy MVP, Wang H, Clare-Salzler M, et al. (2011) Reduced Serum Vitamin D-Binding Protein Levels Are Associated With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 60: 2566-2570
112. Ongagna JC, Pinget M, Belcourt A. (2005) Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes. *Clin Biochem.* 38: 415-419.
113. Pani MA, Donner H, Herwig J, Usadel KH, Badenhop K. (1999) Vitamin D binding protein alleles and susceptibility for type 1 diabetes in Germans. *Autoimmunity.* 31: 67-72.