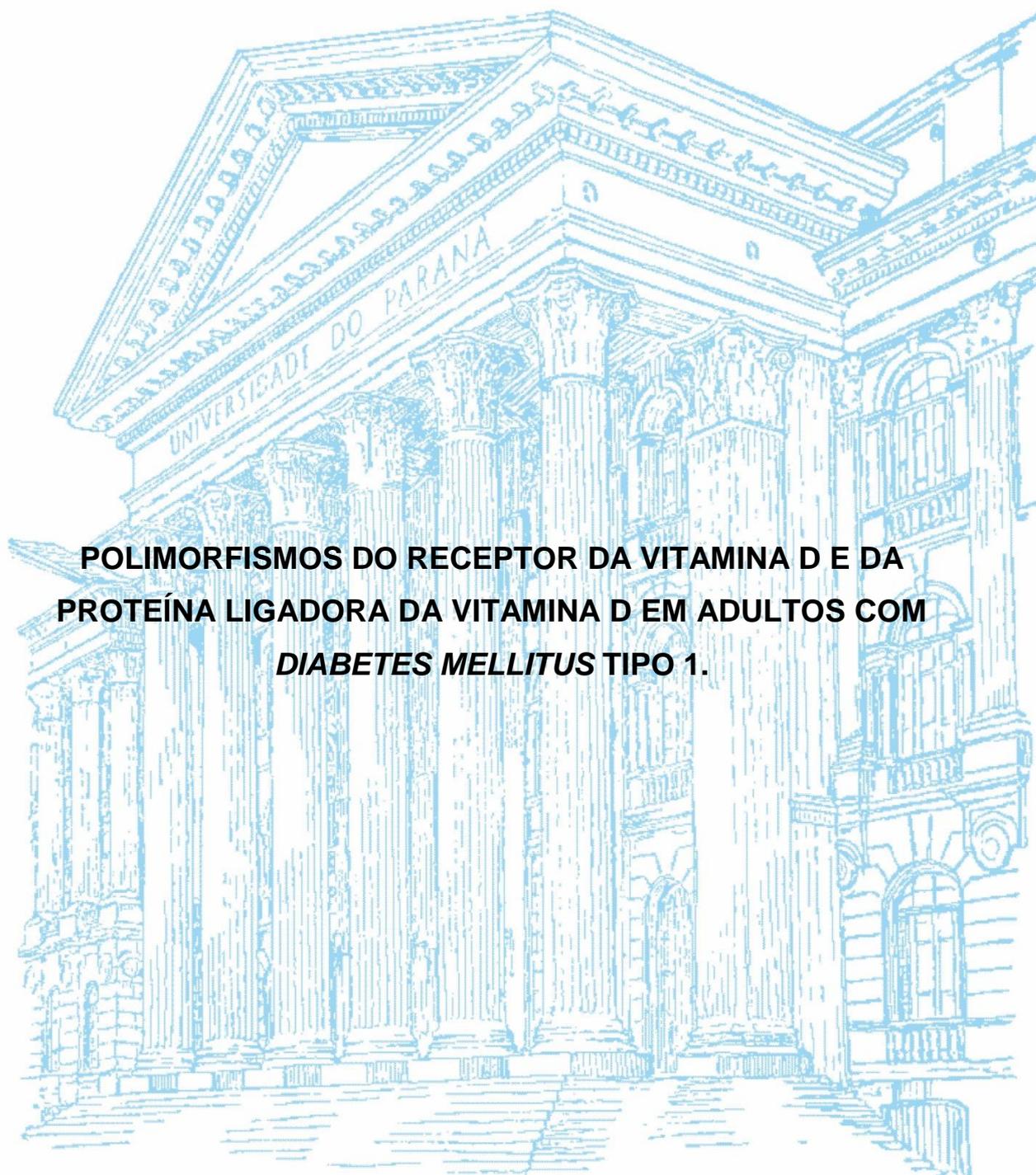


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANA KARLA BITTENCOURT MENDES**



**POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DA VITAMINA D E DA  
PROTEÍNA LIGADORA DA VITAMINA D EM ADULTOS COM  
*DIABETES MELLITUS* TIPO 1.**

**CURITIBA**

**2017**

**ANA KARLA BITTENCOURT MENDES**

**POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DA VITAMINA D E DA  
PROTEÍNA LIGADORA DA VITAMINA D EM ADULTOS COM  
*DIABETES MELLITUS TIPO 1.***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiane Gomes de Moraes Rego.

**Co-orientador:** Prof. Dr. Geraldo Picheth.

**CURITIBA**

**2017**

Mendes, Ana Karla Bittencourt

Polimorfismos do receptor da vitamina D e da proteína ligadora da vitamina D em adultos com *Diabetes mellitus* tipo 1 / Ana Karla Bittencourt Mendes – Curitiba, 2017.  
118 f. ; il. (algumas color.); 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego

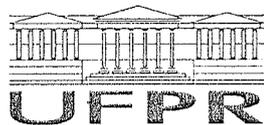
Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Diabetes mellitus*. 2. Vitamina D. 3. Polimorfismo genético. I. Rego, Fabiane Gomes de Moraes. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.462



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de ANA KARLA BITTENCOURT MENDES intitulada: **POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DA VITAMINA D E DA PROTEÍNA LIGADORA DA VITAMINA D EM ADULTOS COM O DIABETES MELLITUS TIPO 1**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua A PROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Novembro de 2017.

FABIANE GOMES DE MORAES REGO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MAUREN ISFER ANGHEBEM OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UFPR)

GERALDO PICHETH  
Avaliador Interno (UFPR)

ANA CLAUDIA BONATTO  
Avaliador Externo (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me guiar e iluminar meus passos.

Dedico este trabalho aos meus pais, Shirley e Jacinto Mendes, meus exemplos de vida, e à minha irmã Laís, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todos os momentos. Sem vocês eu não chegaria até aqui, vocês são meus amores e meu alicerce de vida.

À minha madrinha, Maria da Graça, por ter me acolhido tão carinhosamente em sua residência durante este período do mestrado e cuidado de mim como uma filha. Serei eternamente grata.

Às colegas de laboratório que sempre me ajudaram muito e que, com algumas delas, fiz amizades para a vida toda. Certamente vocês levam uma parcela desta vitória e ficarão para sempre em minhas melhores lembranças. Em especial, à amiga Catiane, que foi um presente de Deus em nossas vidas, e agora está com Ele, olhando por nós.

Aos amigos que a UFPR me presenteou, Fernando, Andressa, Jennifer e Yusra. Vocês tornaram meus dias mais coloridos e alegres. Amizades que levarei para sempre em meu coração. Agradeço especialmente à minha amiga “habibi”, que mesmo com todos os deveres e responsabilidades, me ensinou e me ensina a cada dia, como levar a vida de um jeito mais leve e divertido. Sua amizade é preciosa e muito importante para mim.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Fabiane Rego, e co-orientador Dr. Geraldo Picheth, que contribuíram para o meu crescimento e amadurecimento intelectual e profissional. Agradeço pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e acolhida no laboratório. Vocês são profissionais admiráveis.

À professora Dr<sup>a</sup>. Dayane Alberton, que mesmo em sua rotina corrida, sempre foi muito atenciosa e prestativa, obrigada pelas longas conversas e palavras de conforto e carinho.

Agradeço a todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, que ministraram as disciplinas de mestrado, e que também contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

A todos os meus familiares, que sempre torceram por mim e vibraram com as minhas conquistas, vocês foram e sempre serão muito importantes na minha vida.

Ao meu companheiro, Gabriel Luz, que além de namorado, é um grande amigo, que sempre me apoiou e me incentivou a crescer pessoal e profissionalmente. Obrigada pela compreensão, paciência e por me amparar nos momentos que mais precisei, não saberei retribuir tamanhos carinho e respeito que tivestes por mim.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

*“A persistência é o menor caminho do êxito.”*

Charles Chaplin

## RESUMO

O *Diabetes mellitus* é uma doença global com incidência crescente e com potenciais sérias complicações. O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) envolve a combinação de fatores, tais como, susceptibilidade genética, desregulação imunológica e exposição à gatilhos ambientais. Causado por um processo auto-imune crônico, leva à destruição de células beta pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. Muitos órgãos e as células imunes possuem um receptor para vitamina D (*VDR*). A 1,25-Diidroxivitamina D, carregada por sua proteína ligadora (*DBP*), é um potente imunomodulador que aumenta a produção e secreção de vários hormônios, incluindo a insulina. Os polimorfismos no gene *VDR* e *DBP* foram associados à susceptibilidade ao desenvolvimento do DM1 em algumas populações, assim, estes genes constituem candidatos funcionais. O objetivo deste trabalho foi associar os polimorfismos de nucleotídeo único dos genes *VDR* (rs2228570 e rs731236) e *DBP* (rs4588 e rs7041) com o DM1 em adultos  $\geq 18$  anos (com diagnóstico após 18 anos), num estudo de caso-controle, e a correlação destas variações com os marcadores bioquímicos de perfil glicêmico (glicose, hemoglobina glicada, 1,5-anidroglicitol), perfil lipídico (colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicerídeos), função renal (ureia, creatinina), proteínas totais, albumina e ácido úrico. O projeto teve aprovação do comitê de ética da UFPR (CAAE 01038112.0.0000.0102). Foram estudados 281 adultos, predominantemente Euro-brasileiros, sendo 136 indivíduos com DM1 e 145 indivíduos saudáveis (grupo controle). As genotipagens dos polimorfismos selecionados para o estudo foram realizadas por PCR-RFLP (rs4588 e rs7041) e por sondas TaqMan® (rs2228570 e rs731236). Os polimorfismos em estudo encontram-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Neste estudo os polimorfismos rs731236 ( $P=0,056$ ;  $P=0,525$ ), rs2228570 ( $P=0,480$ ;  $P=0,249$ ) e rs4588 ( $P=0,261$ ;  $P=0,345$ ) não foram associados ao DM1 quando analisados no modelo co-dominante e dominante, respectivamente. O modelo recessivo do rs731236 mostrou significância ( $P=0,017$ ), sugerindo que a presença do alelo C poderia estar associada à proteção em relação ao DM1. Portadores do alelo T (CT+TT) do rs2228570 foram associados à significativa ( $P=0,05$ ) redução do colesterol total, em cerca de 12,7%, somente no grupo controle. A análise dos genótipos para o rs4588 mostrou associação com a concentração aumentada de HDL-colesterol e a presença do alelo C (CC+CA), somente no grupo DM1. As frequências alélicas do rs7041 foram diferentes significativamente entre si ( $P=0,029$ ) e o modelo dominante mostrou significância ( $P=0,029$ ), sugerindo que a presença do alelo T poderia estar associada ao risco, e o alelo G conferir proteção ao DM1. A análise dos genótipos do polimorfismo em questão evidenciaram que portadores do alelo G (GG+GT) no grupo de indivíduos saudáveis tinham concentrações inferiores de 1,5 anidroglicitol, quando comparados ao grupo DM1, caracterizando o mau controle glicêmico deste último. As frequências para os alelos raros dos polimorfismos em estudo foram, no geral, similares aos descritos para outras populações europeias ou Caucasoides e menores quando comparados a Orientais.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*, *VDR*, *DBP*, Polimorfismo.

## ABSTRACT

Diabetes *mellitus* is a global disease with increasing incidence and potential serious complications. Type 1 diabetes (T1D) involves the combination of factors, such as genetic susceptibility, immunological dysregulation, and exposure to environmental triggers. Caused by a chronic autoimmune process, it leads to the destruction of pancreatic beta cells with consequent insulin deficiency. Many immune organs and cells have a receptor for vitamin D (VDR). 1,25-Dihydroxyvitamin D, carried by its binding protein (DBP), is a potent immunomodulator that increases the production and secretion of several hormones, including insulin. Polymorphisms in the VDR and DBP gene were associated with susceptibility to the development of T1D in some populations, thus, these genes are functional candidates. The objective of this study was to associate the single nucleotide polymorphisms of VDR gene (rs2228570 and rs731236) and DBP (rs4588 and rs7041) with DM1 in adults  $\geq$  18 years in a case-control study, and the correlation of these variations with the biochemical markers of glycemic profile (glucose, HbA1c, 1,5-AG), lipid profile (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides), renal function (urea, creatinine), total protein, albumin and uric acid. The project was approved by the Ethics Committee of UFPR (CAAE 01038112.0.0000.0102). A total of 281 Euro-Brazilian adults were studied, 136 subjects with DM1 and 145 healthy subjects (control group). The genotyping of the polymorphisms was performed by PCR-RFLP (rs4588 and rs7041) and TaqMan® probes (rs2228570 and rs731236). The studied variants were in the Hardy-Weinberg equilibrium. This study rs731236 ( $P=0,056$ ;  $P=0,525$ ), rs2228570 ( $P=0,480$ ;  $P=0,249$ ) and rs4588 ( $P=0,261$ ;  $P=0,345$ ) polymorphisms, were not associated with T1D in co-dominant and dominant model, respectively. The recessive model of rs731236 was significant ( $P=0,017$ ), that suggest association of the C allele to be protector to disease. Carriers of the T allele (CT+TT) of rs2228570 were associated with a significant ( $P=0,05$ ) reduction of total cholesterol in about 12.7% in the control group. Genotype analysis for rs4588 showed an association between increased levels of HDL-cholesterol and the presence of the C allele (CC+CA), only in the T1D group. The allele frequencies of rs7041 were significantly different ( $P=0,029$ ) and the dominant model showed significance ( $P=0,029$ ), that suggest association the T allele to be risk, and the G allele protector to DM1. The analysis of variance of the genotypes of this polymorphism showed the G allele (GG+GT) in the healthy group had lower concentrations of 1,5 anhydroglucitol, when compared to the T1D group, characterizing the last group with poor glycemic control. The frequencies to the rare alleles of polymorphisms were generally similar to described for other European or Caucasoid populations and lower when compared to Eastern.

Key words: *Diabetes mellitus*, *VDR*, *DBP*, *Polymorphism*.

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>FIGURA 1</b>	DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL E PROJEÇÃO DA PREVALÊNCIA DO <i>DIABETES MELLITUS</i> PARA O ANO DE 2040	32
<b>FIGURA 2</b>	IMUNOLOGIA DO DM1	34
<b>FIGURA 3</b>	EFEITO DO <i>DIABETES MELLITUS</i> SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E LIPÍDEOS NO ADIPÓCITO	36
<b>FIGURA 4</b>	ESTRUTURA DO MHC HUMANO	42
<b>FIGURA 5</b>	METABOLISMO DA VITAMINA D	44
<b>FIGURA 6</b>	AÇÃO DA 1 $\alpha$ ,25-DIIDROXIVITAMINA D MEDIADA PELO SEU RECEPTOR VDR E SECREÇÃO DE INSULINA	48
<b>FIGURA 7</b>	LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>VDR</i> NO CROMOSSOMO	51
<b>FIGURA 8</b>	LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>DBP</i> NO CROMOSSOMO	53
<b>FIGURA 9</b>	SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENDONUCLEASES	61
<b>FIGURA 10</b>	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	65
<b>FIGURA 11</b>	ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs2228570 DO GENE <i>VDR</i> COM AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DO COLESTEROL TOTAL PARA OS GRUPOS EM ESTUDO	77
<b>FIGURA 12</b>	MAPA DE RESTRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>StyI</i> PARA O POLIMORFISMO rs4588	82
<b>FIGURA 13</b>	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs4588 DO GENE <i>DBP</i>	83
<b>FIGURA 14</b>	ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO rs4588 DO GENE <i>DBP</i> COM A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HDL-COLESTEROL	87
<b>FIGURA 15</b>	MAPA DE RESTRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A <i>HaeIII</i> PARA O POLIMORFISMO rs7041	89

---

<b>FIGURA 16</b>	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs7041 DO GENE <i>DBP</i>	90
<b>FIGURA 17</b>	ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO rs7041 DO GENE <i>DBP</i> COM A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 1,5 ANIDROGLUCITOL	93

---

## LISTA DE TABELAS

		Página
<b>TABELA 1</b>	CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS DE ADULTOS DM1 E CONTROLES SAUDÁVEIS	66
<b>TABELA 2</b>	CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO	70
<b>TABELA 3</b>	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs2228570 DO GENE <i>VDR</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO	74
<b>TABELA 4</b>	COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2228570 DO GENE <i>VDR</i> COM A LITERATURA	75
<b>TABELA 5</b>	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs731236 DO GENE <i>VDR</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO	78
<b>TABELA 6</b>	COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs731236 DO GENE <i>VDR</i> COM A LITERATURA	79
<b>TABELA 7</b>	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs4588 DO GENE <i>DBP</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO	84
<b>TABELA 8</b>	COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs4588 DO GENE <i>DBP</i> COM A LITERATURA	86
<b>TABELA 9</b>	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs7041 DO GENE <i>DBP</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO	90
<b>TABELA 10</b>	COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7041 DO GENE <i>DBP</i> COM A LITERATURA	91

---

## LISTA DE QUADROS

		Página
<b>QUADRO 1</b>	CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	29
<b>QUADRO 2</b>	CLASSIFICAÇÃO DA CETOACIDOSE DIABÉTICA	38
<b>QUADRO 3</b>	RECOMENDAÇÕES DE CONTROLE GLICÊMICO PARA ADULTOS COM DM, DE ACORDO COM AS DIVERSAS SOCIEDADES	40
<b>QUADRO 4</b>	CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO	57
<b>QUADRO 5</b>	PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM SONDAS FLUORESCENTES POR PCR EM TEMPO REAL	59
<b>QUADRO 6</b>	PROTOCOLO UTILIZADO NA TÉCNICA PCR-RFLP PARA GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS rs4588 E rs7041 DO GENE <i>DBP</i>	60
<b>QUADRO 7</b>	PROTOCOLO UTILIZADO PARA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs4588 E rs7041	61
<b>QUADRO 8</b>	CARACTERÍSTICAS DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES EM ESTUDO	63

---

## LISTA DE ANEXOS

		Página
<b>ANEXO 1</b>	TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	114
<b>ANEXO 2</b>	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA ASSINATURA DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA	116
<b>ANEXO 3</b>	QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES	118
<b>ANEXO 4</b>	EXEMPLO DE PCR EM TEMPO REAL PARA O SNP rs2228570 DO GENE <i>VDR</i>	119

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

<b>1,25D</b>	1 $\alpha$ -25-diidroxitamina D
<b>1,5 AG</b>	1,5 anidroglucitol
<b>7-DHC</b>	7-dehidrocolesterol
<b>25D</b>	25-hidroxitamina D
<b>A1C</b>	Fração A1C da hemoglobina
<b>AG</b>	Albumina Glicada
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>Anti-IA2</b>	Antiproteína de Membrana com Homologia às Tirosinofosfatases ou Antiantígeno 2 do Insulinoma.
<b>CAD</b>	Cetoacidose diabética
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CSII</b>	<i>Continuous Subcutaneous Insulin Infusion</i> – Infusão contínua de insulina subcutânea
<b>CTLA4</b>	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated-4</i> – Proteína 4 associada aos linfócitos T citotóxicos
<b>DAC</b>	Doença arterial crônica
<b>DCCT</b>	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i> – Estudo sobre o controle de diabetes e complicações
<b>DM</b>	<i>Diabetes mellitus</i>
<b>DM1</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
<b>DM1A</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 autoimune
<b>DM1B</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 idiopática
<b>DM2</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
<b>DMG</b>	<i>Diabetes mellitus</i> Gestacional
<b>DRC</b>	Doença renal crônica
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> – Órgão Americano Governamental responsável pelo controle de alimentos e medicamentos
<b>FGF23</b>	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i> – Fator de crescimento de fibroblastos 23
<b>GAD</b>	Dexcarboxilase do ácido glutâmico.

---

---

<b>GLUT4</b>	<i>Glucose Transporter 4</i> – Transportador de glicose 4
<b>H-W</b>	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina Glicada fração A1C
<b>HDL-C</b>	HDL- colesterol - <i>High Density Lipoprotein</i> – <i>Cholesterol</i> – Lipoproteína de densidade alta
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus – Vírus da imunodeficiência humana
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitário Humano
<b>IA-2A</b>	<i>Islet Antigen 2</i> – Autoanticorpos anti-ilhotas
<b>IAA</b>	<i>Insulin autoantibodies</i> – Autoanticorpos anti-insulina
<b>IAM</b>	Infarto agudo do miocárdio
<b>ICA</b>	Autoanticorpo Anti-ilhotas de Langerhans Citoplasmático
<b>IDF</b>	<i>International Diabetes Federation</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i> – Interferon gama
<b>IL-1</b>	<i>Interleukin-1</i> – Interleucina-1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<i>Interleukin-1<math>\beta</math></i> – Interleucina-1 $\beta$
<b>IL2RA</b>	<i>Interleukin 2 (IL2) Receptor Alpha</i> – Receptor alfa de interleucina 2
<b>IL-6</b>	<i>Interleukin-6</i> – Interleucina-6
<b>IL-8</b>	<i>Interleukin-8</i> – Interleucina-8
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>INS</b>	<i>Insulin Gene</i> – Gene da insulina humana
<b>IRA</b>	Insuficiência renal aguda
<b>IRC</b>	Insuficiência renal crônica
<b>LDL-C</b>	LDL-Colesterol – <i>Low Density Lipoprotein</i> – <i>Cholesterol</i> – Lipoproteína de densidade baixa
<b>MODY</b>	<i>Maturity onset diabetes of the Young</i> – Diabetes da maturidade de início precoce
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NCoA</b>	<i>Nuclear receptor coactivator</i> – Coativador do receptor nuclear
<b>NCoR</b>	<i>Nuclear receptor corepressor</i> – Corepressor do receptor nuclear

---

---

<b>NGSP</b>	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> – Programa Nacional para Padronização da Hemoglobina Glicada
<b>NPH</b>	<i>Neutral Protamine Hagedorn</i> – Insulina neutra de protamina Hagedorn
<b>OMIM</b>	<i>Mendelian Inheritance in Man</i> – Herança Mendeliana no Homem Online
<b>PAI-1</b>	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> – Inibidor de ativação do pasminogênio
<b>PTH</b>	<i>Parathyroid Hormone</i> – Hormônio paratireóide
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
<b>PTPN22</b>	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor Type 22</i>
<b>RFLP</b>	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
<b>Rs</b>	<i>Reference Sequence</i> – Identificação dos Polimorfismos de único nucleotídeo
<b>RXR</b>	<i>Retinoid X Receptor</i> – Receptor retinóide X
<b>SEMPR</b>	Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de Nucleotídeo Único
<b>SRC</b>	<i>Steroid Receptor Coactivator</i> – Coativador do receptor esteróide
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumoral Necrose Factor <math>\alpha</math></i> – Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<b>TOTG</b>	Teste Oral de Tolerância à Glicose
<b>UFPR</b>	Universidade Federal do Paraná
<b>DBP</b>	<i>Vitamin D Binding Protein</i> – Proteína ligadora da vitamina D
<b>VDR</b>	<i>Vitamin D receptor</i> – Receptor da vitamina D
<b>VDRE</b>	<i>Vitamin D response element</i> – Elemento de resposta à vitamina D
<b>VNTR</b>	<i>Variable Number Tandem Repeat</i> - Número variável de repetições em tandem
<b>ZnT8</b>	<i>Zinc Transporter 8</i> – Transportador de zinco 8

---

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>28</b>
3.1 <i>DIABETES MELLITUS</i> .....	28
3.2 EPIDEMIOLOGIA.....	31
3.3 <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 1A (DM1A) IMUNOMEDIADA.....	32
3.4 COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DM1 .....	34
3.5 BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO.....	39
3.6 ASPECTOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DM1 .....	41
3.7 VITAMINA D E DM1.....	43
3.8 POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO DM1.....	49
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
4.1 AMOSTRAS .....	55
4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	56
4.3 VARIABILIDADES GENÉTICAS EM ESTUDO .....	57
4.4 GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS EM ESTUDO.....	57
4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES .....	62
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	63
4.7 FLUXOGRAMA DE TRABALHO .....	64
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	66
5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	69
5.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	73
5.3.1 Polimorfismo rs2228570 do gene <i>VDR</i> .....	73
5.3.2 Polimorfismo rs731236 do gene <i>VDR</i> .....	78
5.3.3 Polimorfismo rs4588 do gene <i>DBP</i> .....	81
5.3.4 Polimorfismo rs7041 do gene <i>DBP</i> .....	88
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>95</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença crônica e autoimune caracterizada por uma destruição progressiva das células  $\beta$  pancreáticas mediada por uma resposta autoimune celular levando a deficiência de insulina total ou parcial (CRAIG *et al.*, 2014). Tem etiologia multifatorial, porém, os processos específicos em sua patogênese continuam pouco esclarecidos. Hoje, sabe-se que os fatores genéticos e ambientais têm um importante papel no surgimento da doença (NOBLE; VALDES, 2011).

O DM1 representa 5 a 10% dos casos de diabetes (MAAHS *et al.*, 2010) e sua incidência é maior entre o nascimento até os 14 anos de idade (FOROUHI; WAREHAM, 2014) com dois picos de incidência: entre 5 a 7 anos e em torno da puberdade (HARJUTSALO; SJOBERG; TUOMILEHTO, 2008). O DM1 é a desordem metabólica crônica comum em crianças, contudo sua incidência varia significativamente entre diferentes países e dentro de um mesmo país (KARVONEN *et al.*, 2000). Nos últimos anos um aumento significativo do número de casos de DM1 tem sido documentado mundialmente, particularmente em crianças mais jovens (BORCHERS; UIBO; GERSHWIN, 2010). Calcula-se que o DM1 está aumentando em uma taxa de aproximadamente 3 a 5% por ano (PATTERSON, C. C. *et al.*, 2009). Entre os países com maior número de casos de DM1 por ano figuram Estados Unidos (13 mil), Índia (10.900) e Brasil (5 mil) (PATTERSON, C. *et al.*, 2014).

Muitos estudos têm demonstrado que o DM1 é uma doença poligênica na qual as manifestações clínicas estão condicionadas por diferentes combinações de genes de susceptibilidade. Os principais *loci* dos genes associados à susceptibilidade ao DM1 estão dentro da região do antígeno leucocitário humano (HLA) no cromossomo 6. Em particular os alelos de classe II, alelos específicos nos *loci* DRB1, DQA1 e DQB1, foram fortemente associados com o DM1 (KAWABATA *et al.*, 2002; IKEGAMI *et al.*, 2007; THOMSON *et al.*, 2007; POCIOT *et al.*, 2010; ROJAS-VILLARRAGA; BOTELLO-CORZO; ANAYA, 2010). Contudo, múltiplos *loci* não-HLA também têm sido reportados conferindo risco para doença, incluindo gene da insulina (INS), do antígeno 4 associado com Linfócito T Citotóxico (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* - CTLA4), da proteína tirosina fosfatase não

receptora tipo 22 (*protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22* - PTPN22), da subunidade alfa do receptor de interleucina 2 (*interleukin 2 receptor alpha* - IL2RA), do interferon induzido com o domínio C da helicase 1 (*interferon induced with helicase C domain 1* - IFIH1), do domínio lectina tipo C membro A da família 16 (*C-type lectin domain family 16 member A* - CLEC16 A), e da proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 2 (*protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2* - PTPN2) (MORAHAN, 2012).

Atualmente acredita-se que fatores ambientais capazes de alterar a penetrância dos principais genes de susceptibilidade ou capazes de aumentar a penetrância de genes de baixo risco possam ter papel no desencadeamento da auto-imunidade e desenvolvimento do DM1 (BARBEAU, 2012). Componentes da dieta dos bebês (incluindo leite de vaca e glúten), aumento da idade materna, aumento da taxa de crescimento pós-natal, deficiência de vitamina D, exposição a químicos, e modificações da microbiota intestinal podem estar associados com o DM1 (ILONEN *et al.*, 2009; ROSE *et al.*, 2013; GULDEN; WONG; WEN, 2015).

Vários genes envolvidos nas vias metabólicas da vitamina D têm sido implicados em processos que levam a sua deficiência (BERRY; HYPONEN, 2011) e variantes genéticas em alguns destes genes têm sido associadas ao DM1 (ALIZADEH; KOELEMAN, 2008). Entre os principais genes envolvidos na via da vitamina D encontram-se o receptor da vitamina D (*vitamin D receptor* – VDR) e a proteína ligadora da vitamina D (*vitamin D binding protein* – DBP) (BERRY; HYPONEN, 2011).

As variações estruturais do gene VDR, tanto em polimorfismos silenciosos quanto naqueles que produzem mudança estrutural, têm sido estudados em diferentes populações e associados com variações na estrutura corporal (massa óssea, peso ao nascer, altura final) e na susceptibilidade a várias doenças (osteopenia/osteoporose, hiperparatiroidismo, neoplasias primárias e secundárias, osteoartrite, DM1, DM2, entre outras) (ZMUDA; CAULEY; FERRELL, 2000; CSASZAR; ABEL, 2001).

A proteína ligadora da vitamina D é a principal transportadora de vitamina D e seus metabólitos no plasma. Altamente polimórfica, desempenha propriedades multifuncionais, reunindo mais de 120 variantes alélicas já descritas (SPEECKAERT *et al.*, 2006). Dois polimorfismos de nucleotídeo único

(SNPs) não sinônimos (rs4588 e rs7041) têm sido bem caracterizados no gene *DBP*, sendo capazes de influenciar o metabolismo da vitamina D (FU *et al.*, 2016).

Alguns estudos avaliaram a associação de variantes genéticas/fenotípicas dos genes *VDR* e *DBP* com um número significativo de patologias em seres humanos, várias das quais, constituem problemas globais de saúde de grande relevância para a saúde pública (CAKIR *et al.*, 2016; JOLLIFFE *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016; PENNA-MARTINEZ; BADENHOOP, 2017; QUAN *et al.*, 2017). Entretanto, algumas controvérsias ainda existem na correlação entre os polimorfismos genéticos destes genes e a ocorrência do diabetes.

A referida pesquisa pretende investigar a possível correlação entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em regiões do gene *VDR* rs731236 e rs2228570 e do gene *DBP* rs4588 e rs7041 com a susceptibilidade ao DM1.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Buscar associação entre polimorfismos do receptor da vitamina D e proteína ligadora da vitamina D com o diabetes *mellitus* tipo 1 em adultos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e coletar amostras de pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 1 e controles saudáveis;
- Genotipar os polimorfismos rs2228570 e rs731236 do receptor da vitamina D, bem como os rs4588 e rs7041 da proteína ligadora de vitamina D em pacientes com DM1 e indivíduos saudáveis (controles);
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos em estudo e sua possível associação com o DM1;
- Associar as variações genéticas estudadas com os biomarcadores em estudo, com ênfase em marcadores de controle glicêmico e perfil lipídico.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DIABETES MELLITUS

O *Diabetes mellitus* (DM) é caracterizado como uma condição crônica, resultante de um conjunto heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação, secreção de insulina ou ambas, e é diagnosticado pelas concentrações elevadas de glicose plasmática.

A classificação atual do DM baseia-se na etiologia e não no tipo de tratamento. De acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA), o diabetes inclui quatro classes:

- *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1): resultante da destruição das células beta, geralmente levando à absoluta deficiência à insulina;
- *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2): resultante da perda progressiva da secreção de insulina pelas células beta, é frequentemente associada à resistência à insulina periférica;
- *Diabetes mellitus* Gestacional (DMG): diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, que claramente, não seja diabetes prévio à gestação;
- Tipos específicos de *Diabetes mellitus* devido a outras causas: esta categoria engloba síndromes do diabetes monogênico (como o diabetes neonatal e o diabetes da maturidade de início precoce [MODY; *maturity-onset diabetes of the Young*]), doenças do pâncreas exócrino (tais como fibrose cística) e o diabetes induzido pelo uso de medicamentos ou substâncias químicas (tais como a utilização de glucocorticóides no tratamento do HIV/AIDS ou após transplante de órgãos) (WHO, 2016; ADA, 2017a).

O DM1 e o DM2 são as formas da doença mais frequentes na população mundial. O DM1 está presente em 5% a 10% dos casos de diabetes e é o resultado da destruição parcial ou total de células beta pancreáticas com consequente deficiência de insulina. Na maioria dos casos, essa destruição é

mediada por autoimunidade (DM1A), porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referidos os fatores ambientais ou como forma idiopática (DM1B) (SBD, 2016c). Além do componente autoimune, o DM1A apresenta intensa associação a determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), alelos que podem suscitar o desenvolvimento da doença ou proteger contra ela (TODD; BELL; MCDEVITT, 1987). Os pacientes com DM1B (idiopático) manifestam insulinopenia permanente e são propensos a cetoacidose, mas não têm evidência de auto-imunidade contra as células beta, nem tanto associado a haplótipos do sistema HLA. Embora, apenas uma reduzida parcela de pacientes desenvolve este tipo de diabetes, muitos são de descendência africana ou asiática. Indivíduos com DM1 tipo B sofrem de cetoacidose episódica e exibem graus variáveis de deficiência de insulina (ADA, 2017b).

O DM2 está presente em 90-95% dos casos de diabetes e é caracterizado por resistência periférica à insulina, que ao longo do tempo, pode levar a deficiência na produção e ação deste hormônio (IDF, 2015; ADA, 2017a). O diabetes pode ser diagnosticado com base nos critérios de glicose plasmática, conforme o Quadro 1.

QUADRO 1 – CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS.

Glicemia ao acaso $\geq 200$ mg/dL (11,1 mmol/L). Em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica;
<b>ou</b>
Glicemia em jejum $\geq 126$ mg/dL (7,0 mmol/L). O jejum é definido como a não ingestão calórica por pelo menos 8 horas;*
<b>ou</b>
Glicemia 2h após 75g de glicose oral $\geq 200$ mg/dL (11,1 mmol/L). O teste deve ser realizado como descrito pela OMS utilizando dose oral de glicose contendo o equivalente a 75g de glicose dissolvida em água;*
<b>ou</b>
HbA1C $\geq 6,5\%$ (48 mmol/mol). O teste deve ser realizado usando o método certificado pelo <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> (NGSP) e nos padrões da <i>Diabetes Control and Complications Trial</i> (DCCT).*

\* Na ausência de glicemia inequívoca, os resultados devem ser confirmados com a repetição dos testes.

FONTE: (ADA, 2017a).

A dosagem da glicemia ao invés da HbA1C deve ser utilizada para o diagnóstico do aparecimento agudo do DM1 em indivíduos com sintomas de

hiperglicemia (ADA, 2017b). Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2015), uma glicemia ao acaso  $\geq 200$  mg/dL associada aos seguintes sintomas clínicos, já fornecem diagnóstico para DM1:

- Sede anormal e boca seca (polidipsia);
- Micção frequente (poliúria);
- Falta de energia, cansaço extremo;
- Fome constante (polifagia);
- Perda de peso repentina;
- Visão turva.

O DM1A, a forma mais frequente do DM1, é caracterizada pela presença de auto-anticorpos circulantes. Os marcadores de autoimunidade incluem auto-anticorpos contra células beta pancreáticas e auto-anticorpos para insulina, mediadas por linfócitos T, sendo eles, auto-anticorpos citoplasmáticos anti-ilhotas (*islet cell autoantibodies* – ICA), auto-anticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico (*glutamic acid decarboxylase autoantibodies* - GADA), auto-anticorpos antiproteína de membrana com homologia às tirosinofosfatases ou anti-antígeno 2 do insulinoma (*insulinoma associated 2 autoantibodies* - IA-2A), auto-anticorpos anti-insulina (*insulin autoantibodies* - IAA), e auto-anticorpos antitransportador de zinco 8 (*zinc transporter autoantibodies* - ZnT8). Mais de 90% dos indivíduos com DM1 apresenta um ou mais destes marcadores autoimunes no momento do diagnóstico (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). A persistência de dois ou mais auto-anticorpos prediz o DM1 clínico. Triagem para o DM1 com painel de anticorpos é correntemente recomendado apenas para estudos de pesquisa ou em familiares em primeiro grau de um paciente com DM1 (ADA, 2017b).

Crianças e adolescentes podem apresentar cetoacidose como a primeira manifestação da doença. Outras formas clínicas podem se apresentar com discreta hiperglicemia em jejum, que pode ser rapidamente alterada para hiperglicemia severa e/ou cetoacidose na presença de alguma infecção ou *stress* (ADA, 2017b).

Em algumas partes do mundo, onde o DM1 é menos frequente, os sintomas podem ser confundidos com outras doenças, sendo essencial que a glicose sanguínea seja mensurada quando um ou mais dos sintomas citados acima estejam presentes.

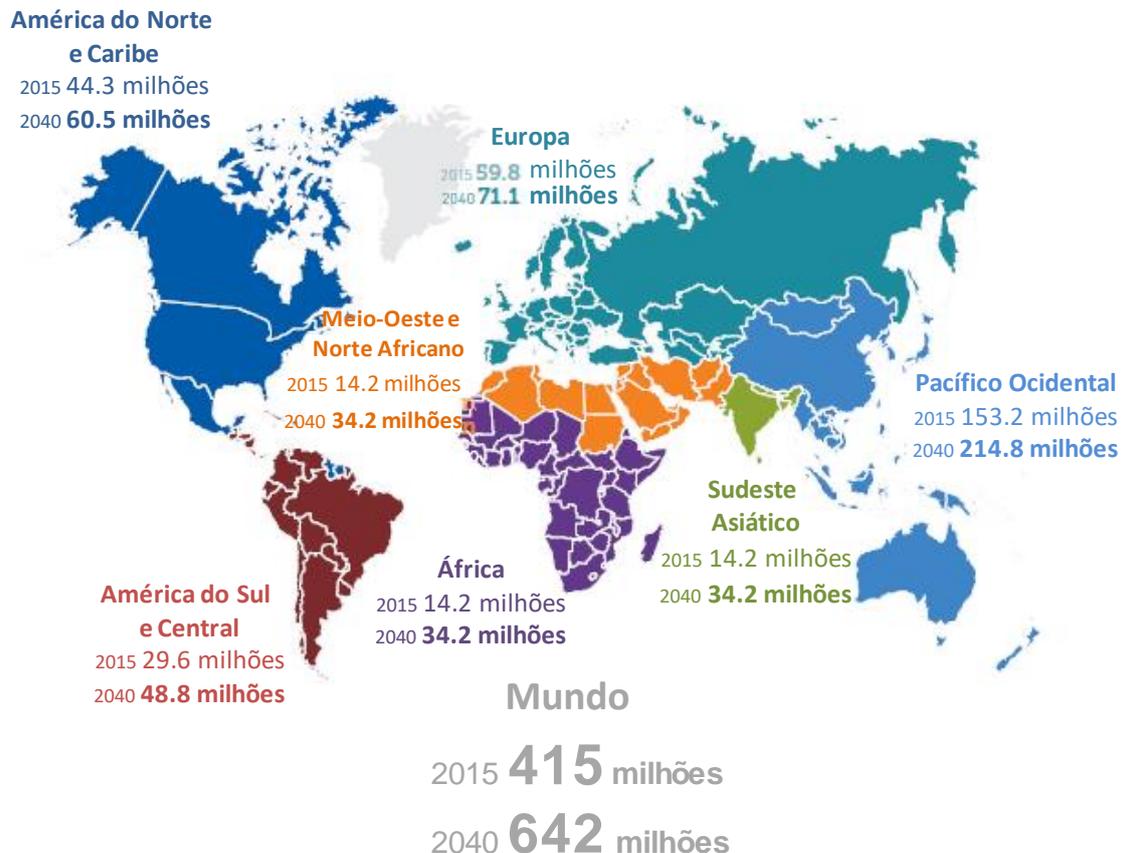
### 3.2 EPIDEMIOLOGIA

Diabetes é considerado como uma das maiores emergências de saúde mundial do século 21 (IDF, 2015). A prevalência global vem aumentando nas últimas décadas e indivíduos com diabetes apresentam maior risco de morbidade e mortalidade em comparação a população em geral (OGURTSOVA *et al.*, 2017). Este aumento progressivo pode ser explicado em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da acelerada urbanização, da prevalência progressiva de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevida dos pacientes com a doença (WHITING *et al.*, 2011). Cerca de 80% desses indivíduos vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade e há crescente proporção de pessoas acometidas em grupos etários mais jovens (IDF, 2014).

De acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017), mais de 16 milhões de brasileiros adultos sofrem de diabetes e a doença mata mais de 72 mil pessoas por ano no Brasil, representando 6% de todas as mortes. A prevalência de diabetes no país é de 8,1%, ligeiramente abaixo da média mundial, e é maior nas mulheres (8,8%) do que nos homens (7,4%) (OMS, 2017).

Até o ano de 2015, a estimativa era de 415 milhões de adultos (prevalência de ~8.8% ao ano), com idade entre 20 e 79 anos, portadores de diabetes em todo o mundo, e mais de meio milhão de crianças, com idade entre 14 anos ou menos, vivendo com DM1. Se esse aumento for progressivo, a projeção para 2040 é que sejam mais de 642 milhões de indivíduos (prevalência de ~10.4% ao ano) convivendo com a doença (Figura 1). Para o mesmo ano, o diabetes resultou em 5 milhões de mortes, com um custo relativo entre US\$ 673 e US\$ 1.197 bilhões em despesas de saúde pública (IDF, 2015), representando um fardo significativamente oneroso para a economia mundial. Para o ano de 2040, estudos prospectivos estimam gastos da ordem de 802 bilhões de dólares destinados ao diabetes, representando aproximadamente 12% das despesas globais em saúde (IDF, 2015). Os 5 milhões de mortes atribuídas ao diabetes em 2015 é maior do que a soma do número de mortes anuais por HIV/AIDS (1,2 milhões) tuberculose (1,5 milhão) e malária (0,4 milhões) (WHO, 2016).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL E PROJEÇÃO DA PREVALÊNCIA DO DIABETES MELLITUS PARA O ANO DE 2040.



Estimativa do número de pessoas afetadas pelo diabetes em todo o mundo, subdividido por região em 2015 e 2040 com idade entre 20 e 79 anos.

FONTE: Adaptado de IDF 2015a.

Os estudos de incidência são geralmente restritos ao DM1, pois suas manifestações iniciais tendem a ser bem características. A incidência de DM1 mostra acentuada variação geográfica, apresentando taxas por 100 mil indivíduos com menos de 15 anos de idade: 38,4 na Finlândia, 7,6 no Brasil e 0,5 na Coreia, por exemplo (ONKAMO *et al.*, 1999). Atualmente, sabe-se que a incidência de DM1 tem aumentado, particularmente na população infantil com menos de 5 anos de idade (KARVONEN *et al.*, 2000).

### 3.3 DIABETES MELLITUS TIPO 1A (DM1A) IMUNOMEDIADA

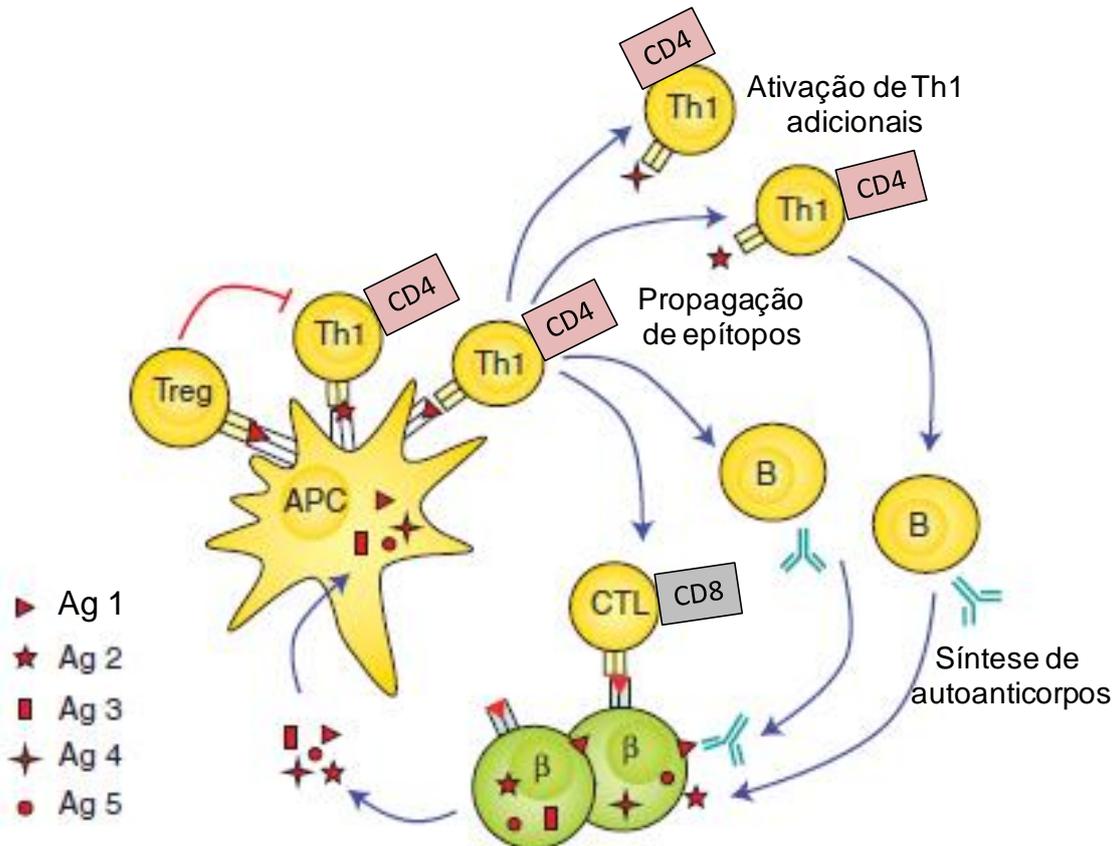
Anteriormente chamado de “diabetes insulino-dependente” ou “diabetes juvenil”, o DM1 caracteriza-se pela destruição imunomediada, parcial ou total,

de células beta pancreáticas presentes nas ilhotas de Langerhans, impossibilitando a produção e secreção do hormônio insulina pelo pâncreas.

Apresenta potencial para graves complicações, sendo a segunda doença crônica mais frequente na infância (menos prevalente apenas que a asma) e sua incidência vem aumentando nas últimas décadas, especialmente nas faixas etárias menores (SPERLING, 1997; RENNERT; FRANCIS, 1999), contudo, medidas preventivas e uma terapia causal para DM1 ainda não foram bem estabelecidas.

A fisiopatologia do DM1A envolve fatores genéticos e ambientais (KAWASAKI; ABIRU; EGUCHI, 2004). Certas infecções virais, deficiência de vitamina D e fatores nutricionais (ex., introdução precoce de leite bovino) estão entre os potenciais fatores ambientais para o desencadeamento da autoimunidade em indivíduos geneticamente susceptíveis (SBD, 2016b). O resultado é a ativação de células do sistema imune que promovem a destruição das células beta pancreáticas. Este processo se dá por um complexo mecanismo mediado por células T, em que as células dendríticas (DC) imunogênicas desempenham um papel fundamental (Figura 2) (ZHOU; TEDDER, 1995). A destruição é causada pela infiltração das ilhotas de Langerhans por células dendríticas imunogênicas, macrófagos e linfócitos T, especificamente em células beta (células  $\beta$ ) produtoras de insulina, não afetando células produtoras de glucagon (células  $\alpha$ ) ou somatostatina (células  $\delta$ ). Citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo infiltrado leucitário e células beta, incluindo interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), desempenham um papel central na deficiência das células beta e no desenvolvimento do diabetes. A exposição prolongada a estas citocinas leva a uma diminuição da capacidade das células beta em produzir e liberar insulina, que a longo prazo, são destruídas por apoptose ou necrose (STANKOV; BENC; DRASKOVIC, 2013). Como resultado, os indivíduos afetados são incapazes de produzir insulina adequada para regulação das concentrações plasmáticas de glicose no sangue.

FIGURA 2 – IMUNOLOGIA DO DM1.



Perda de tolerância imunológica aos auto-antígenos nas células beta pancreáticas. Os antígenos de células beta são captados e apresentados por células apresentadoras de antígeno (APC) às células T autorreativas (Th1, células T helper 1), levando a perda de tolerância. As células T autorreativas adicionais podem tornar-se ativadas (propagação de epítopos), o que pode contribuir para a destruição de células beta ou representar autoimunidade não destrutiva. A ativação de células T CD8 autorreativas pode levar ao reconhecimento e destruição das células beta pancreáticas. As células T CD4 ativam as células B para produzir autoanticorpos contra a insulina. A apresentação de autoantígenos para o sistema imune também pode levar à ativação de células T regulatórias (Treg) que conduzem à inibição da autoimunidade próinflamatória das células beta pancreáticas. CTL, células T efectoras. B, linfócitos B.

FONTE: Adaptado (ROEP; PEAKMAN, 2012)

A velocidade de destruição de células beta é muito variável, sendo alta principalmente em neonatos e crianças e baixa em adultos (POUDEL *et al.*, 2015).

### 3.4 COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DM1

Em condições normais, a insulina suprime produção hepática de glicose e a lipólise e estimula a exposição dos transportadores de glicose nas células

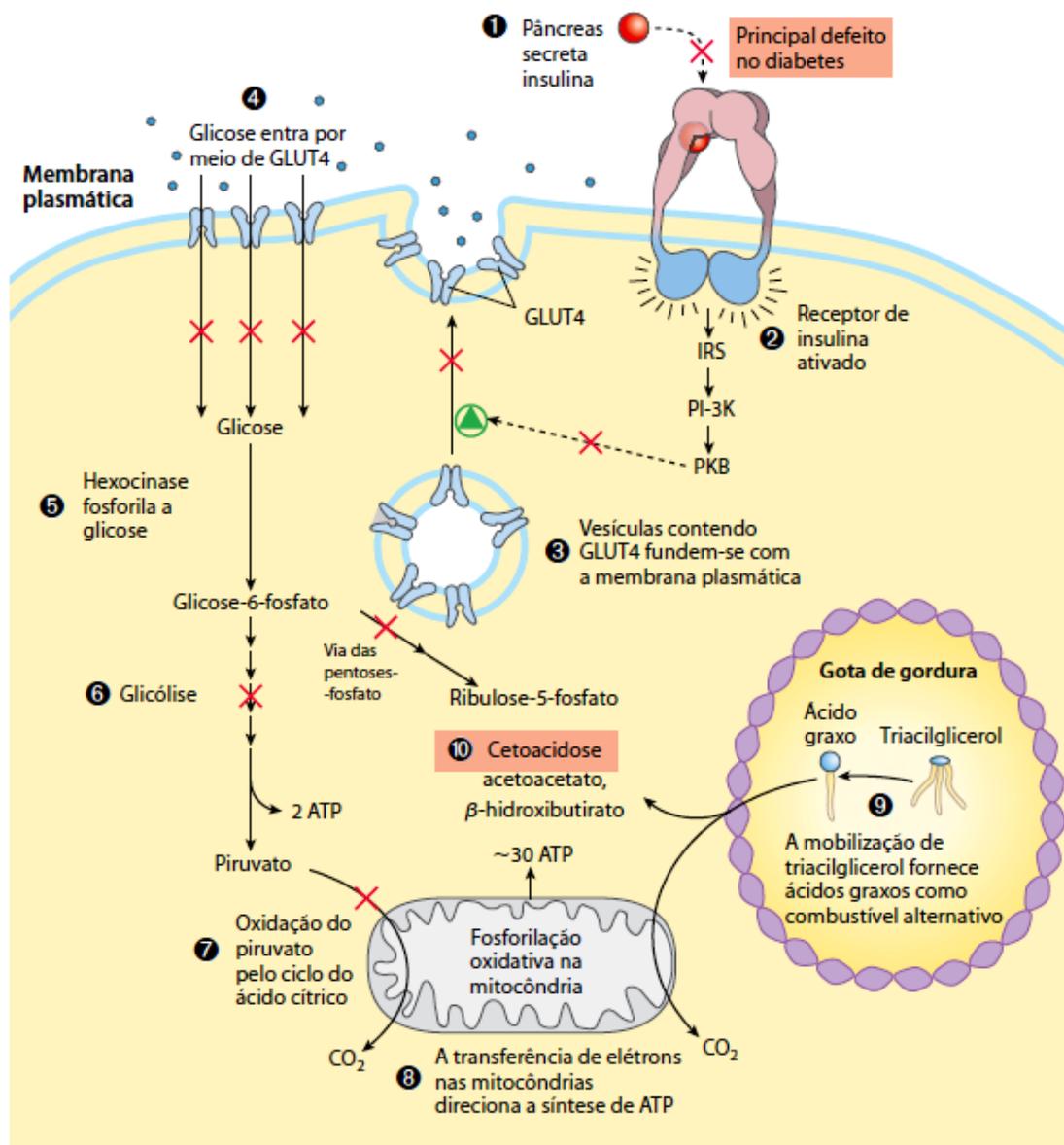
do músculo esquelético, músculo cardíaco e adiposo (GLUT4) que estão armazenados em pequenas vesículas intracelulares (JAMES; PIPER, 1994; JAMES; PIPER; SLOT, 1994). A insulina também promove a captação de glicose pelas células e aumenta a síntese de glicogênio, ácidos graxos e proteínas, tendo papel fundamental na conversão do excesso de glicose em duas formas de armazenamento, glicogênio e triacilgliceróis, além de contribuir para a manutenção da homeostase da glicose (RAMESAN; SHARMA, 2009).

As deficiências de insulina em conjunto com as altas concentrações de hormônios contra-regulatórios provocam acentuada hiperglicemia, aumento de aminoácidos e ácidos graxos livres (Figura 3). A deficiência de insulina acarreta uma superprodução de glicose hepática enquanto que as concentrações elevadas de glucagon e catecolaminas resultam em aumento da glicogenólise e gliconeogênese (DELANEY; ZISMAN; KETTYLE, 2000; KITABCHI *et al.*, 2001) e a incapacidade de desencadear a captação de glicose pelas células do músculo esquelético, músculo cardíaco e adiposo (GERICH *et al.*, 1976; JAMES; PIPER, 1994). Concentrações elevadas de cortisol estimulam o catabolismo proteico com consequente aumento das concentrações circulantes de aminoácidos, que fornecem uma fonte de produção de glicose adicional através da gliconeogênese hepática. Ocorre o estímulo da lipólise e inibição da lipogênese, resultando em concentrações exacerbadas de ácidos graxos livres circulantes. Estes ácidos graxos livres são captados pelo fígado e oxidados em corpos cetônicos ( $\beta$ -hidroxibutirato e acetoacetato). Os corpos cetônicos são ácidos relativamente fortes que se dissociam em pH fisiológico, produzindo uma grande carga de íons hidrogênio. Além disso, há diminuição do metabolismo periférico de corpos cetônicos, o que agrava ainda mais a hipercetonemia e a acidose metabólica (ELEDRISI *et al.*, 2006). As altas concentrações de catecolaminas, cortisol e hormônio do crescimento, juntamente com a cetose e a acidose levam à redução da captação de glicose pelos tecidos e prejudicam a ação e secreção da insulina, piorando ainda mais o quadro hiperglicêmico (KITABCHI *et al.*, 2001).

O ambiente hiperglicêmico conduz ao aumento da osmolalidade do fluido extracelular, levando ao deslocamento hídrico intracelular para o compartimento extracelular. Este mecanismo provoca desidratação e induz a perda de eletrólitos para fora das células, o que resulta em diurese osmótica,

com perda de água e eletrólitos pela urina, causando hipovolemia e depleção de eletrólitos no organismo (ELEDRISI *et al.*, 2006).

FIGURA 3 – EFEITO DO DIABETES MELLITUS SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E LIPÍDEOS NO ADIPÓCITO.



No diabetes, a exposição dos transportadores GLUT4 na membrana plasmática, assim como outros processos normalmente estimulados pela insulina, estão inibidos como indicado por X. A deficiência de insulina impede a captação de glicose pelo GLUT4, como consequência as células são privadas de glicose, enquanto ela está elevada na corrente sanguínea. Sem glicose para o suprimento de energia, os adipócitos degradam triacilgliceróis, estocados em gotas de gordura, e fornecem os ácidos graxos resultantes para outros tecidos para a produção mitocondrial de ATP. Dois subprodutos da oxidação dos ácidos graxos acumulam-se no fígado (acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato) e são liberados na corrente sanguínea, diminuindo o pH do sangue e causando a cetoadicose.

FONTE: (NELSON; COX, 2014).

Com a hiperglicemia acentuada, o limiar renal de reabsorção da glicose também é excedido, podendo ser observado episódios de glicosúria (glicose na urina). Os corpos cetônicos exercem diurese osmótica adicional juntamente com a excreção de eletrólitos carregados positivamente, como o sódio, potássio, magnésio e cálcio (ELEDRISI *et al.*, 2006).

Em pacientes com DM1 não tratados, a superprodução de acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato leva ao seu acúmulo no sangue, e consequente redução do pH sanguíneo leva à cetoacidose diabética (CAD). A CAD é tipicamente caracterizada por acidose metabólica, cetose e hiperglicemia (ELEDRISI *et al.*, 2006; AGARWAL *et al.*, 2016; NYENWE; KITABCHI, 2016) e constitui uma das principais complicações agudas do DM1 (WEINSTOCK *et al.*, 2013).

Os sintomas oriundos do mau controle glicêmico que levam a cetoacidose são geralmente de curta duração, perdurando por alguns dias ou até menos de 24 horas (KITABCHI *et al.*, 2004) e incluem poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso, vômitos, dor abdominal, desidratação, fadiga, sonolência e em casos mais graves, podem ocorrer alterações neurológicas. Alterações no exame físico incluem desidratação, ressecamento nas mucosas, hálito cetônico, respiração de *Kussmaul* (respiração rápida e profunda) e taquicardia. Se não monitorado corretamente, o paciente pode progredir para hipotensão, choque e perda de consciência (coma) (ELEDRISI *et al.*, 2006; NYENWE; KITABCHI, 2016). Portanto, o monitoramento frequente do estado hemodinâmico do paciente com cetoacidose é crucial (KITABCHI *et al.*, 2004).

Para estabelecer o diagnóstico de CAD (Quadro 2), os seguintes componentes devem ser considerados (KITABCHI *et al.*, 2004; ELEDRISI *et al.*, 2006):

- Glicose plasmática elevada (>250 mg/dL),
- Aumento dos corpos cetônicos no soro ou na urina, e
- Presença de acidose (bicarbonato sérico <18 mmol/L e/ou pH <7,30).

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO DA CETOACIDOSE DIABÉTICA.

	Suave	Moderada	Severa
Bicarbonato sérico (mEq/L)	15-18	10-15	>15
pH arterial	7,25-7,30	7,0-7,24	<7,0
Ânion gap*	>10	>12	>12
Estado mental	Alerta	Alerta/sonolento	Estupor/coma

\*Ânion gap, calculado como [sódio – (cloreto – bicarbonato)] (valor normal:  $10 \pm 2$  mmol/L).

FONTE: Adaptado de (ELEDRISI *et al.*, 2006).

O monitoramento da CAD inclui terapia de fluidos e eletrólitos, insulino-terapia, tratamento de quaisquer causas desencadeantes identificadas (por exemplo, falha na bomba contínua de infusão de insulina subcutânea (CSII), sepse, pneumonia, pancreatite aguda, acidente vascular cerebral (AVC), infarto agudo do miocárdio (IAM), trauma, medicamentos que afetam o metabolismo de carboidratos), monitoramento da terapia e complicações resultantes (ELEDRISI *et al.*, 2006; NYENWE; KITABCHI, 2016). A administração de fluidos deve ser realizada cuidadosamente com o objetivo de prevenir o edema cerebral, uma doença rara, mas debilitante e com potenciais complicações, podendo ser fatal (ELEDRISI *et al.*, 2006).

A hiperglicemia crônica é responsável pelo desenvolvimento de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença isquêmica do coração, doença cerebrovascular, e doença vascular periférica) (FLORYS *et al.*, 2004; RUBIO CABEZAS; ARGENTE OLIVER, 2007), sendo que a doença cardiovascular é a causa mais comum de morte entre os indivíduos com diabetes (MORRISH *et al.*, 2001; SNELL-BERGEON; NADEAU, 2012; LEE, S. I. *et al.*, 2015).

Muitos indivíduos com diabetes desenvolvem alguma forma de doença ocular (retinopatia), com risco potencial de danos na visão e até provocar cegueira. A rede de vasos sanguíneos que irrigam a retina pode ser danificada na retinopatia, levando à perda permanente da visão. Concentrações persistentemente elevadas da glicemia são a principal causa de retinopatia (JAIN; SARRAF; FONG, 2003).

Indivíduos com diabetes podem apresentar problemas de má circulação, principalmente nos membros inferiores, resultando em danos nos vasos

sanguíneos. Estes problemas aumentam o risco de ulceração, infecção e amputação dos pés. Indivíduos com diabetes correm risco de amputação 25 vezes maior do que indivíduos sem a doença. Contudo, com tratamento e acompanhamento adequados, grande proporção de amputações pode ser evitada (RASMUSSEN *et al.*, 2016).

A doença renal (nefropatia) é muito mais comum em indivíduos com diabetes do que naqueles sem a doença, sendo esta, uma das principais causas de doença renal crônica (DRC). A DRC é causada devido ao dano dos pequenos vasos sanguíneos, o que pode levar a uma perda parcial ou total da função renal. A manutenção das concentrações plasmáticas de glicose sanguínea e pressão arterial mais próximos possível da normalidade reduz consideravelmente o risco de nefropatia (BJORNSTAD; CHERNEY; MAAHS, 2014).

Essas complicações vasculares acometem indivíduos com DM1A que apresentam a doença em torno de 15 a 20 anos, sendo incomum antes dos 5 anos de idade. O controle glicêmico e o monitoramento adequado são essenciais para a prevenção das complicações crônicas ou para retardar suas manifestações (SBD, 2016b).

### 3.5 BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO

O monitoramento glicêmico visa à prevenção das complicações agudas e crônicas e é fundamental no manejo do diabetes. As metas para controle glicêmico incluem controle das glicemias de jejum, pós-prandial e hemoglobina glicada fração HbA1C (SBD, 2016b).

A dosagem de hemoglobina glicada (HbA1C) é considerada “padrão ouro” para o controle glicêmico no diabetes e apresenta algumas vantagens em relação ao teste oral de tolerância à glicose e à glicemia de jejum, incluindo maior conveniência (jejum não requerido), maior estabilidade pré-analítica e menor *stress* durante a coleta. Porém, ao utilizar a HbA1C para diagnóstico do diabetes, é de extrema importância considerar a idade, a raça/etnia e a presença de anemia/hemoglobinopatias no indivíduo, a fim de minimizar os casos de falso negativo ou falso positivo. As concentrações de HbA1C refletem

o controle glicêmico do paciente diabético referente aos 2-3 meses anteriores a coleta.

O Quadro 3 resume as recomendações para as metas de controle glicêmico pelas principais sociedades.

QUADRO 3 – RECOMENDAÇÕES DE CONTROLE GLICÊMICO PARA ADULTOS COM DM, DE ACORDO COM AS DIVERSAS SOCIEDADES.

Instituições	Glicemia pré-prandial (mg/dL)	Glicemia pós-prandial (mg/dL)	HbA1C (%)
ADA	80 a 130	< 180	< 7
IDF	< 115	< 160	< 7
AACE	< 110	< 140	< 7
SBD	< 110	< 160	< 7

ADA, Associação Americana de Diabetes; IDF, Federação Internacional de Diabetes; AACE, Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos; SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. FONTE: SBD, 2016.

O 1,5-anidroglicitol (1,5AG), também considerado um biomarcador de controle glicêmico, é um poliol obtido pela alimentação e pouco metabolizado pelo organismo. Em estados de normoglicemia, o 1,5AG é reabsorvido 99,9% nos túbulos renais e seu mecanismo de absorção é semelhante ao da glicose (KOGA, 2014). Com a condição de hiperglicemia a longo prazo, grandes quantidades de glicose presentes são filtradas persistentemente, e por competitividade inibem a reabsorção de 1,5AG nos túbulos renais (SU *et al.*, 2017). Portanto, no estado hiperglicêmico, a excreção urinária de 1,5AG aumenta e a sua concentração sérica diminui em pacientes com diabetes (KOGA, 2014). Os valores séricos de 1,5AG variam rapidamente de acordo com as concentrações plasmáticas de glicose e refletem um controle glicêmico dos 3-7 dias que antecedem a coleta (WANG, Y. *et al.*, 2017).

Outro método proposto como um indicador de hiperglicemia é a frutossamina, sendo uma alternativa útil nos casos em que a confiabilidade da dosagem de HbA1C é comprometida por fatores que interferem neste parâmetro (ex: anemias ou hemoglobinopatias). A frutossamina mede a glicação das proteínas séricas de um modo geral, das quais a principal é a albumina. Como a albumina tem um *turnover* de 2 semanas, a frutossamina reflete o controle glicêmico ao longo deste período (10 a 14 dias) (SBD, 2016b).

A dosagem de albumina glicada vem ganhando interesse como um potencial marcador de controle glicêmico (FREEDMAN, 2012). Albumina glicada é uma cetoamina formada a partir da oxidação não enzimática da albumina pela glicose. Como a meia-vida da albumina é de aproximadamente 15 dias, a albumina glicada é uma medida de controle glicêmico de curto prazo (2 a 3 semanas) e, como tal, pode atuar como um índice de tempo intermediário do controle glicêmico. No entanto, os resultados podem ser afetados por idade, estado nutricional, albuminúria, cirrose, disfunção da tireoide e tabagismo (SBD, 2016b).

### 3.6 ASPECTOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DM1

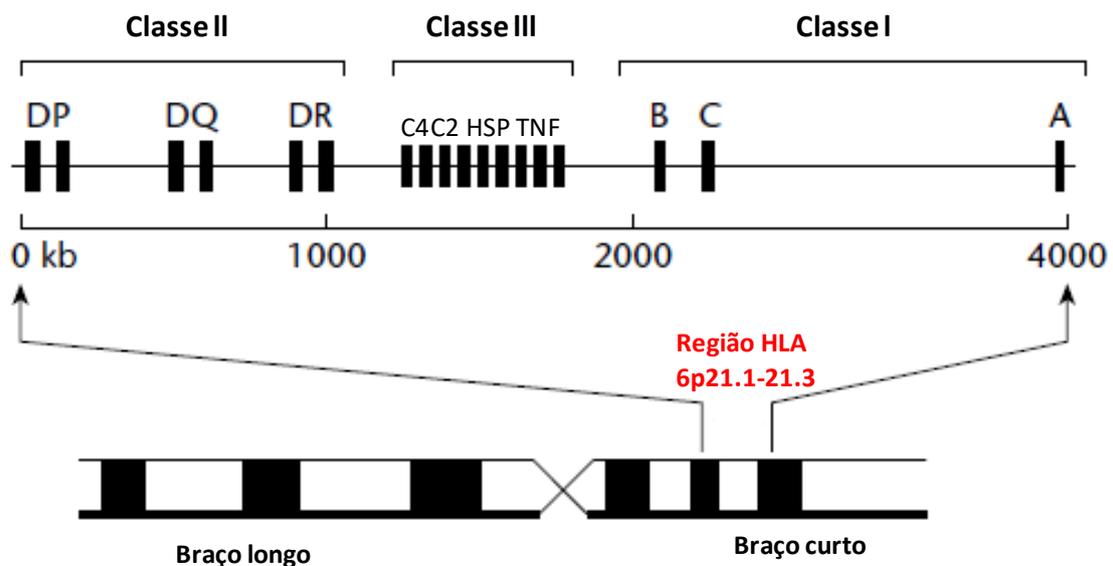
A susceptibilidade ao DM1, no qual o sistema imune destrói as células  $\beta$  produtoras de insulina, possui um forte componente genético (REDONDO *et al.*, 2008). O DM1 é uma doença poligênica com quase 40 *loci* conhecidos por afetarem a susceptibilidade a doença (BARRETT *et al.*, 2009). Quatro décadas de estudos têm mostrado que os genes de imunidade, especialmente aqueles que codificam os Antígenos Leucócitos Humanos clássicos (*Human Leukocyte Antigen* - HLA); conferem o mais forte risco genético à doença (RISCH, 1987; NOBLE *et al.*, 1996).

Localizada no cromossomo 6p21, a região HLA (Figura 4) fornece 50% da susceptibilidade genética para o risco de DM1 (NOBLE *et al.*, 2010). Estudos recentes sugerem que os genes HLA contribuem primariamente para o desenvolvimento dos auto-anticorpos (ADA, 2015). Existem três classes HLA, designadas I, II e III, sendo o HLA de classe II haplótipos *DRB1*, *DQA1*, e *DQB1* os que conferem mais forte associação com risco de DM1 (ERLICH *et al.*, 2008). Estudos realizados em diferentes populações investigaram o risco dos haplótipos HLA-DRB1-DQB1 e observaram que vários haplótipos estão associados com diferentes espectros de risco para a doença, variando de forte susceptibilidade até quase completa proteção (MIJOVIC *et al.*, 1991; NOBLE *et al.*, 1996; SHE, 1996; PARK *et al.*, 1998; CUCCA *et al.*, 2001; SCHIPPER *et al.*, 2001; KOELEMAN *et al.*, 2004).

Além da região HLA, inúmeros outros *loci* gênicos tem mostrado associação com DM1. Outros genes que também contribuem para o risco do

DM1 são INS-VNTR (*Insulin - Variable Number Tandem Repeat*), PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*), CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte associated-4*) e IL2RA (*IL-2 receptor complex locus*) (BARRETT *et al.*, 2009).

FIGURA 4 – ESTRUTURA DO MHC HUMANO.



### Cromossomo 6

Estrutura gênica do MHC humano identificando os genes HLA de classe I (HLA-A, B e C), de classe II (HLA-DR, DQ e DP), e os de classe III.  
 FONTE: Adaptado de (MEHRA; KAUR, 2001).

A maioria dos *loci* associados ao risco de DM1 estão supostamente envolvidos com respostas autoimunes, suportando a ideia de que as influências genéticas envolvem mecanismos que contribuem coletivamente para a resposta autoimune, incluindo o desenvolvimento e manutenção da tolerância. Este mecanismo pode ajudar a explicar a diferença nas taxas de progressão para DM1 em adultos *versus* crianças, onde apenas pequenas variações na susceptibilidade genética foram notados (HOWSON *et al.*, 2011). Evidências confirmam que a susceptibilidade genética também influencia as respostas aos estímulos ambientais ou fisiológicos.

### 3.7 VITAMINA D E DM1

Várias vias e o metabolismo característico da vitamina D, tais como análogos de vitamina D e polimorfismos no receptor da vitamina D, bem como genes que codificam enzimas específicas das vias metabólicas da vitamina D recentemente têm sido associados com o DM1 (ALIZADEH; KOELEMAN, 2008).

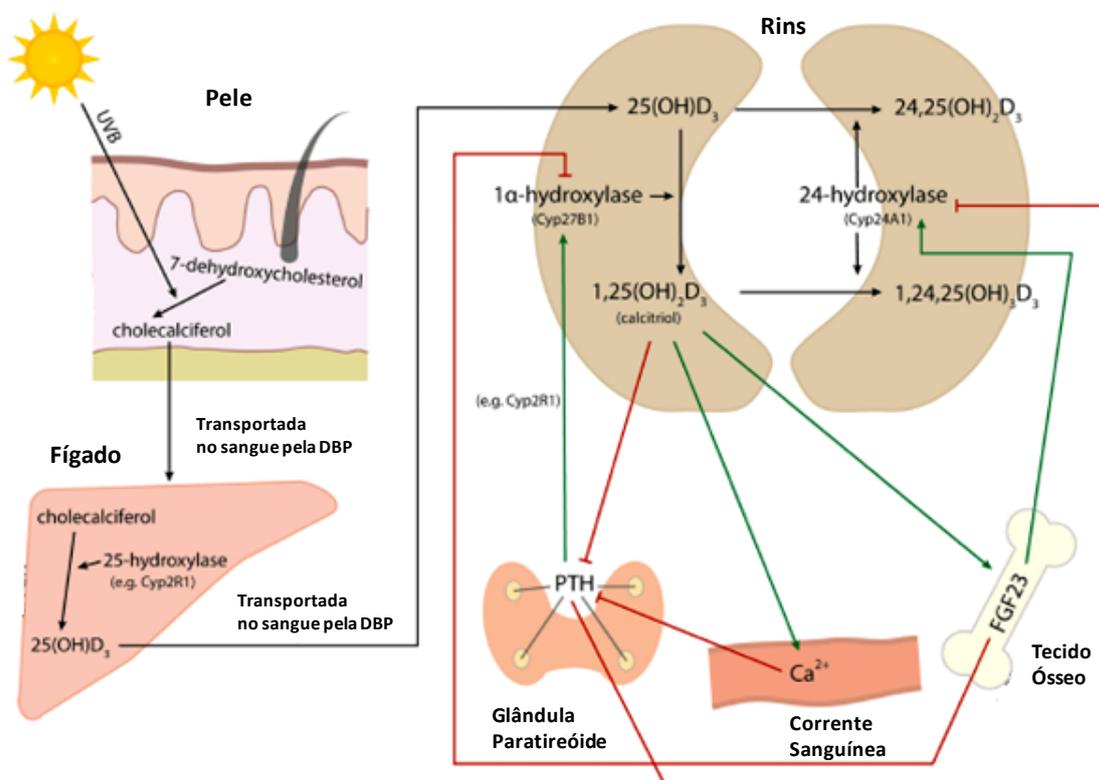
O termo vitamina D compreende um grupo de moléculas secosteroides derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC) interligadas através de uma cascata de reações fotolíticas que acontecem em células de diferentes tecidos. Sob essa denominação ampla abrangem-se tanto o metabólito ativo (1 $\alpha$ ,25-diidroxi-vitamina D ou calcitriol) como seus precursores (entre eles a vitamina D3 ou colecalciferol, vitamina D2 ou ergosterol e a 25-hidroxivitamina D ou calcidiol) e os produtos de degradação, os quais ainda podem manter alguma atividade metabólica. Este sistema abrange as diversas moléculas que compõem o grupo vitamina D, sua proteína carreadora (*vitamin D binding protein* - DBP), seu receptor (*vitamin D receptor* - VDR) e pelas enzimas que participam da cascata de reações de ativação e inativação (HAUSSLER *et al.*, 2013).

O precursor hormonal da vitamina D3 é obtido através da dieta ou sintetizado pela pele a partir do 7-DHC, através de uma reação não-enzimática, dependente da luz UV. Nos seres humanos, apenas 10% a 20% da vitamina D necessária à adequada função do organismo provém da dieta. As principais fontes dietéticas são a vitamina D3 (colecalciferol, de origem animal, presente nos peixes gordurosos de água fria e profunda, como atum e salmão) e a vitamina D2 (ergosterol, de origem vegetal, presente nos fungos comestíveis). Os restantes 80% a 90% são sintetizados endogenamente (HOLICK, 2008).

A vitamina D3, ou colecalciferol, é biologicamente inerte e requer duas reações de hidroxilação sucessivas para sua ativação (ALTIERI *et al.*, 2017) (Figura 5). O colecalciferol liga-se à proteína plasmática de ligação à vitamina D (DBP) e é então transportado para o fígado, onde sofre hidroxilação na posição C-25 da sua cadeia lateral, produzindo a 25-hidroxivitamina D3, 25(OH)D<sub>3</sub>, principal forma circulante da vitamina D. As enzimas do citocromo P-450 (CYP2R1 e CYP27B1) catalisam a hidroxilação no carbono 1 da 25(OH)D, convertendo 25(OH)D<sub>3</sub> em 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

ou 1,25D) (DANKERS *et al.*, 2016). O passo final na produção da sua forma hormonal ocorre principalmente, mas não exclusivamente, nos rins através de uma reação, altamente regulada, de  $1\alpha$ -hidroxilação. A 1,25D, também denominada calcitriol, torna-se o metabólito ativo da vitamina D, que acoplada a DBP, é direcionada a vários tecidos alvos para exercer suas ações endócrinas, mediadas pelo receptor de vitamina D (VDR) (HAUSSLER *et al.*, 2013).

FIGURA 5 – METABOLISMO DA VITAMINA D.



Via metabólica da vitamina D. As setas vermelhas indicam inibição e as setas verdes indicam indução. Para que o processo de ativação da vitamina D se inicie, é preciso que o indivíduo receba luz solar direta, especificamente a radiação ultravioleta B (UVB). O colecalciferol, sintetizado pela pele a partir do 7-DHC, liga-se à proteína plasmática de ligação à vitamina D (DBP) e é transportado para o fígado, onde sofre hidroxilação na posição C-25 da sua cadeia lateral, produzindo a 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>. A 25(OH)D<sub>3</sub> é então carregada principalmente para os rins, onde a enzima  $1\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1) é expressa nos túbulos renais proximais. O CYP27B1 é induzido pelo hormônio paratireoideiano (PTH) que converte 25OH D<sub>3</sub> em 1,25-dihidroxivitamina D (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Este último é lançado na corrente sanguínea e também induz a atividade da enzima 24-hidroxilase (CYP24A1), levando a síntese dos metabólitos menos ativos da vitamina D, 1,24,25-tri-hidroxivitamina D (1,24,25 (OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>) e 24,25-dihidroxivitamina D (24,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). A 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> atua em órgãos alvos suprimindo a síntese de PTH pelas glândulas paratireóides, modulando os osteoblastos e osteoclastos na reabsorção óssea, aumentando a absorção de fosfato e cálcio no intestino e estimulando a expressão do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23), que suprime a atividade de CYP27B1.

FONTE: Adaptado de (DANKERS *et al.*, 2016).

Para controlar as concentrações de calcitriol, a 24-hidroxilase CYP24A1 hidroxila  $25(\text{OH})\text{D}_3$  ou  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na posição C-24, produzindo os metabólitos menos ativos da vitamina D,  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ , respectivamente (CHRISTAKOS *et al.*, 2010). As concentrações de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  são determinados principalmente pelo equilíbrio entre CYP27B1 e CYP24A1. Duas proteínas importantes na regulação desse equilíbrio são o fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) e hormônio paratireóide (PTH). FGF23 desloca o equilíbrio em direção a CYP24A1, inativando a sinalização da vitamina D e é induzido por altas concentrações de  $1,25\text{D}$  e baixas concentrações de fosfato sérico. Já o PTH, favorece o equilíbrio em direção a CYP27B1 e ativação da sinalização de vitamina D. A glândula paratireóide também expressa a proteína VDR, que quando acoplada a  $1,25\text{D}$  suprime a síntese do hormônio paratireóide (PTH) por ação direta na transcrição gênica (DEMAY *et al.*, 1992), assim, PTH é inibido por altas concentrações de  $1,25\text{D}$  e induzido por baixas concentrações de cálcio sérico (CHRISTAKOS *et al.*, 2010).

Os efeitos biológicos da  $1,25\text{D}$  são mediados pelo seu receptor (VDR, *vitamin D receptor*), um fator de transcrição que pertence à família dos receptores hormonais nucleares (DANKERS *et al.*, 2016) e que, em associação ao receptor retinóide (RXR), regula a expressão de genes que controlam funções como proliferação, diferenciação, metabolismo, ionização, transporte e apoptose, em uma variedade de tipos celulares (HAUSSLER *et al.*, 1998). O VDR é expresso em quase todas as células humanas e participa, de maneira direta ou indireta, da regulação de cerca de 500 genes (BOUILLON *et al.*, 2008). A estrutura do VDR é preservada em mamíferos, aves, anfíbios e peixes de esqueleto calcificado (por exemplo, peixe zebra), com um alto grau de homologia em sua estrutura e funcionalidade (BOUILLON *et al.*, 2008). Entre as poucas células que não apresentam receptores para vitamina D, estão as hemáceas, células musculares estriadas maduras e algumas células altamente diferenciadas do sistema nervoso central, como as células de Purkinje e os neurônios do setor CH4 do prosencéfalo basal (EYLES *et al.*, 2005).

O VDR age por meio da heterodimerização com uma das três isoformas do receptor do retinoide X (RXR). Assim, em sua estrutura, ele apresenta domínios específicos para o acoplamento da  $1,25\text{D}$ , heterodimerização com o RXR, ligação ao DNA e ativação da transcrição (BOUILLON *et al.*, 2008). A

1,25D liga-se à porção hidrofóbica do VDR induzindo uma mudança conformacional e formação do complexo transcricional hormônio-receptor (ROCHEL *et al.*, 2000). Esse complexo hormônio-receptor é heterodimerizado com o RXR e esse heterodímero 1,25D-VDR-RXR acopla-se a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos, denominada elemento responsivo à vitamina D (*vitamin D response element* - VDRE) (HAUSSLER *et al.*, 2013) (Figura 6). Entretanto, para promover a ativação ou a supressão gênica, o heterodímero recruta complexos de proteínas corregulatórias (DANKERS *et al.*, 2016). Essas moléculas co-ativadoras (como alguns membros da família SRC - *steroid receptor coactivator* - e o NCoA-62) e co-supressoras (como o NcoR - *nuclear receptor corepressor* e SMRT - *silent mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*) do VDR é que permitem a resposta biológica. Ao recrutar estes complexos, a ligação VDR-RXR modula a transcrição de genes que codificam proteínas que promulgam funções da vitamina D. O complexo 1,25D-VDR controla a expressão de pelo menos onze genes (SPP1, TRPV6, LRP5, BGP, RANKL, OPG, CYP24A1, PTH, FGF23, PHEX e klotho) que codificam proteínas envolvidas na homeostase mineral e óssea e contribuem para o envelhecimento celular (HAUSSLER *et al.*, 2010). Assim, a ação da vitamina D depende da sua síntese metabólica ou aporte de concentrações suficientes de 1,25D, da expressão dos coreceptores VDR e RXR e da programação de respostas transcricionais em células específicas, com o intuito de regular certos genes que codificam proteínas atuantes na modulação dos efeitos da vitamina D (HAUSSLER *et al.*, 2013).

O principal papel fisiológico da 1,25D é a regulação do metabolismo mineral e ósseo (ALTIERI *et al.*, 2017). Algumas de suas funções, há tempo conhecidas, envolvem a regulação do metabolismo do cálcio e do fósforo, elevando as concentrações plasmáticas destes íons através da absorção intestinal e renal e facilitando a mineralização, bem como a ativação da reabsorção óssea como parte do ciclo de remodelação esquelética (HAUSSLER *et al.*, 2010; DANKERS *et al.*, 2016).

Contudo, o papel da vitamina D vai além dessa premissa. A 1,25D age através do seu receptor, influenciando uma série de outros eventos celulares. Um importante efeito extra-esquelético do complexo 1,25D-VDR envolve a diferenciação de certas células epiteliais (JOSHI *et al.*, 2011) e células

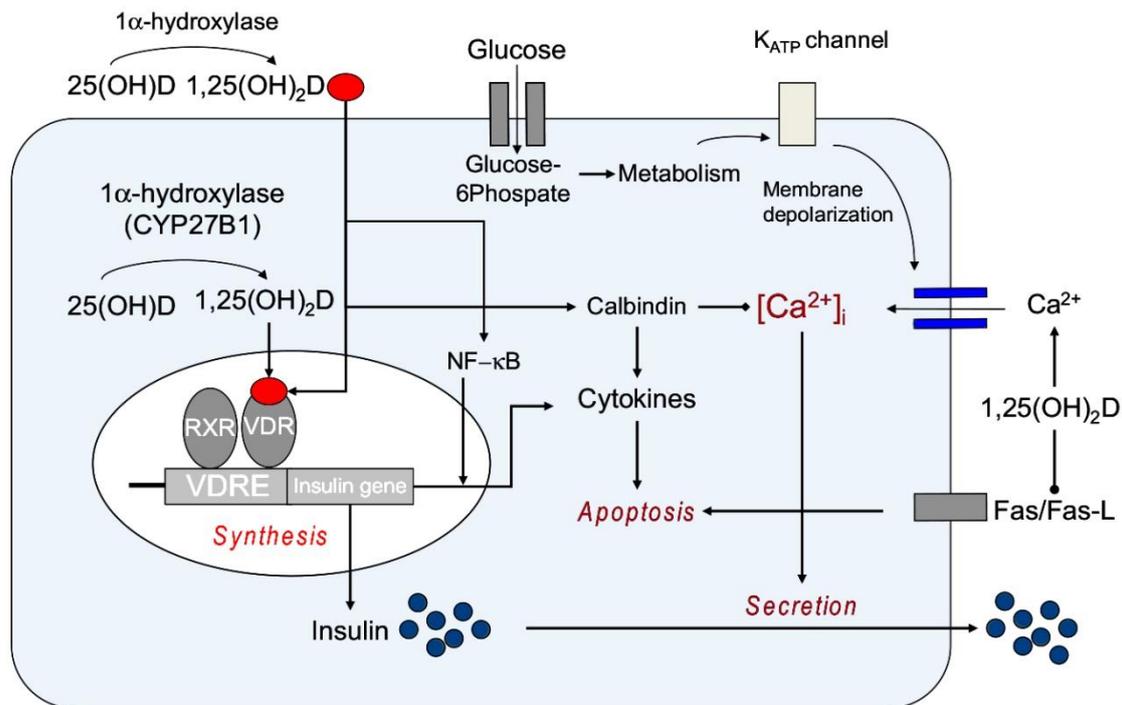
envolvidas no processo inato e adaptativo, que modulam o sistema imunológico (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008).

No contexto das doenças autoimunes, vários estudos correlacionaram o estado nutricional da vitamina D e polimorfismos genéticos no seu receptor (VDR) com a incidência e gravidade da doença, investigando sobre o uso potencial da vitamina D no tratamento de pacientes com doenças auto-imunes (DANKERS *et al.*, 2016). Um estudo com população da Finlândia, por exemplo, sugeriu que o desenvolvimento do DM1 está associado à baixa ingestão de vitamina D pela dieta e sinais de raquitismo durante o primeiro ano de vida. Uma suplementação adequada de vitamina D em lactentes poderia contribuir para a redução na incidência crescente da doença. Porém, esses achados não foram surpreendentes em vista do fato de que a vitamina D atua como agente imunossupressor e o DM1 ser uma doença autoimune (HYPPONEN *et al.*, 2001).

A deficiência de vitamina D também tem sido associada a algumas patologias, incluindo a esclerose múltipla (EBERS, 2008; PUGLIATTI *et al.*, 2008; TARDIEU; MIKAELOFF, 2008), artrite reumatóide (AR) (MAALEJ *et al.*, 2005; GHELANI *et al.*, 2011), DM 1 (FASSBENDER *et al.*, 2002; AUDI *et al.*, 2004), DM2 (BOUCHER, 2002; CYGANNEK *et al.*, 2006; DILMEC *et al.*, 2010; FREDERIKSEN *et al.*, 2013) e alguns tipos de câncer (GARCIA-QUIROZ *et al.*, 2012; GRANT *et al.*, 2013; SHAHBAZI *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2013), embora resultados inconsistentes têm sido relatados entre os diferentes grupos.

A 1,25D também desempenha importante papel no controle do metabolismo glicídico. Estudos sugerem que a influência da 1,25D na homeostase glicídica seja mediada por ações diretas nas células beta-pancreáticas, as quais expressam CYP27B1 e VDR. Os prováveis mecanismos envolvidos no controle da síntese e secreção da insulina envolveriam a modulação do influxo e da reserva de  $Ca^{2+}$  no citosol, por mecanismos rápidos não genômicos do receptor VDR na membrana das células beta-pancreáticas, facilitando a clivagem da pró-insulina em insulina pelas endopeptidases cálcio-dependentes e estimulando a exocitose dos grânulos de insulina (BOURLON; FAURE-DUSSERT; BILLAUDEL, 1997) (Figura 6).

FIGURA 6 – AÇÃO DA  $1\alpha,25$ -DIIDROXIVITAMINA D MEDIADA PELO SEU RECEPTOR VDR E SECREÇÃO DE INSULINA.



A vitamina D pode interferir na função das células beta-pancreáticas de várias formas. Através da circulação sanguínea, a forma ativa da vitamina D, (1,25D), entra na célula beta-pancreática e interage com o receptor VDR formando um complexo com o receptor de ácido retinóico (RXR). Este complexo (1,25D-VDR-RXR) liga-se ao elemento de resposta da vitamina D (VDRE) situado na região promotora do gene da insulina humana, aumentando assim a ativação transcricional do gene da insulina e conseqüentemente a síntese de insulina. A vitamina D pode contribuir para a sobrevivência das células beta-pancreáticas através da inativação do fator nuclear-kB (NF-kb) e modulação dos efeitos das citocinas. O efeito anti-apoptótico da vitamina D pode também ser mediado por vias de baixa transcrição (Fas/Fas-L). A ativação da vitamina D também ocorre intracelularmente pela 1- $\alpha$ -hidroxilase, expressa nas células beta. A vitamina D também regula a calbindina, uma proteína citosólica de ligação ao cálcio encontrada nas células beta, que atua como um modulador de liberação de insulina estimulada pela despolarização através da regulação do cálcio intracelular. Calbindina também pode proteger contra a morte celular apoptótica através da sua capacidade de armazenamento de cálcio intracelular. Os efeitos da vitamina D podem ser mediados indiretamente através de seu importante papel na regulação do cálcio extracelular, fluxo de cálcio através das células beta-pancreáticas e cálcio intracelular. Alterações no fluxo de cálcio podem influenciar diretamente a secreção de insulina, um processo altamente dependente deste íon.  
 FONTE: (MITRI; PITTAS, 2014).

Funções adicionais atribuídas a 1,25D envolvem proteção do sistema vascular, reduzindo o risco de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral, controle do sistema imune adaptativo, reduzindo a incidência de doenças autoimunes, degradação de componentes xenobióticos em vários tecidos e ação anti-inflamatória e anticancerígena sobre células epiteliais propensas a tumores malignos (HAUSSLER *et al.*, 2013).

### 3.8 POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO DM1

Estudos genéticos populacionais e familiares conduzidos nas últimas três décadas têm fornecido uma explicação para quase 80% da herança genética do DM1, confirmando a importância do papel genético como fator de risco para o DM1 (STANKOV; BENC; DRASKOVIC, 2013).

Adicionalmente à predisposição genética, acredita-se que outros fatores influenciam a taxa e o tempo em que a doença inicia em indivíduos geneticamente predispostos. Estudos em gêmeos mostraram que, em alguns casos, a taxa de concordância e o tempo de desenvolvimento de DM1 em gêmeos monozigóticos eram incompletos e muito diferentes, respectivamente. Além disso, o rápido aumento da incidência de DM1 nos últimos 60 anos não pode ser explicado apenas pela genética (BORCHERS; UIBO; GERSHWIN, 2010; WANG, Z. *et al.*, 2016). Este aumento significativo da incidência do DM1 mundialmente sugere a importância das interações entre a predisposição genética e fatores ambientais na etiologia multifatorial do DM1 (PATTERSON, C. C. *et al.*, 2009; POLYCHRONAKOS; LI, 2011).

Entre os fatores ambientais implicados, inclui-se a exposição à vitamina D (FORLENZA; REWERS, 2011). Evidências crescentes têm elucidado o papel da vitamina D na susceptibilidade ao DM1 (HYPPONEN *et al.*, 2001). A vitamina D confere importantes propriedades imunomoduladoras (LEMIRE, 1992) e sua depleção ou resistência relativa pode desempenhar papel significativo na etiologia, tanto do DM1 quanto do DM2, possivelmente através de efeitos sobre a secreção de insulina (HITMAN *et al.*, 1998).

Segundo LEE, S. *et al.* (1994) a deficiência de vitamina D está relacionada com o impedimento na síntese e secreção de insulina em seres humanos e animais com diabetes, o que sugere, uma contribuição no desenvolvimento da doença. Há evidências que sugerem que a homeostase alterada da vitamina D e do cálcio também desempenham um papel no desenvolvimento do diabetes.

Foi demonstrado que polimorfismos no gene do receptor de vitamina D (VDR) são determinantes na síntese de mRNA e na expressão proteica (OGUNKOLADE *et al.*, 2002), podendo também afetar as concentrações plasmáticas de 1,25 (OH) e a resposta à vitamina D via oral (ZMUDA;

CAULEY; FERRELL, 2000). Uma associação entre polimorfismos do receptor VDR e DM1 foi relatado em populações sul-indianas (MCDERMOTT *et al.*, 1997), alemãs (PANI *et al.*, 2000) e taiwanesas (CHANG *et al.*, 2000).

Outro componente essencial na via da vitamina D é a polimórfica proteína carreadora de vitamina D (DBP). Além de sua principal função no transporte de vitamina D e preservação, foi mostrado que DBP atua na captação (*scavenge*) de actina, liga ácidos graxos, ativa macrófagos, estimula os osteoclastos, melhora a atividade quimiotáxica de péptidos derivados de C5, e associa-se às superfícies de células imunes, como células T e B (GOMME; BERTOLINI, 2004). Alguns estudos associaram polimorfismos específicos no gene DBP com a presença de DM1 e DM2 (ONGAGNA *et al.*, 2001; ONGAGNA; PINGET; BELCOURT, 2005).

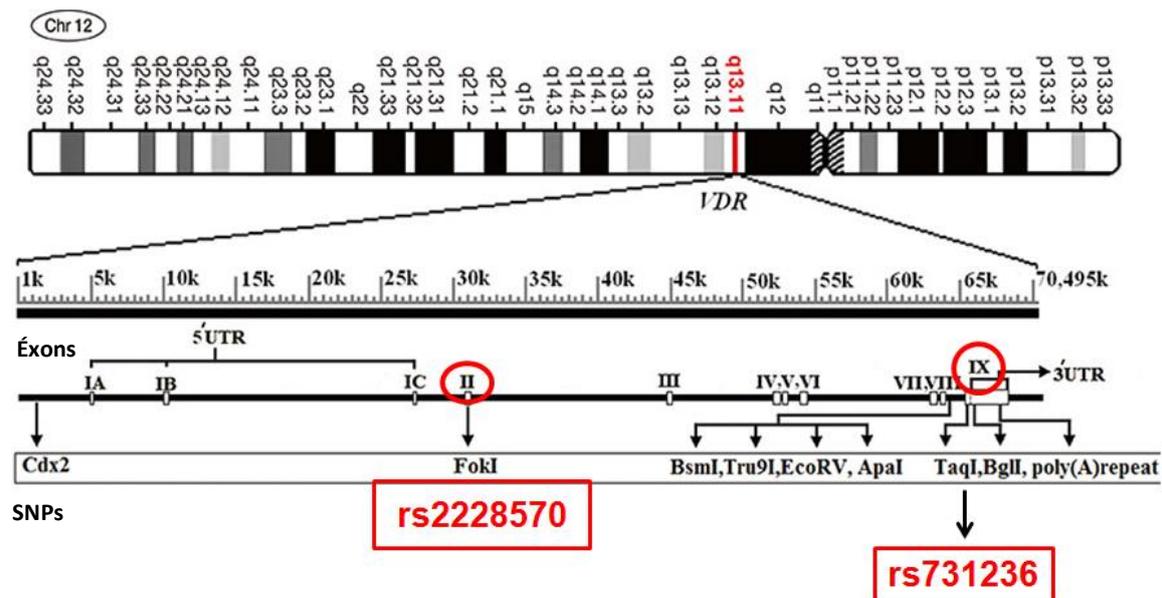
### 3.8.1 Gene *VDR*

O gene *VDR* contribui para susceptibilidade a diversas doenças (VALDIVIELSO; FERNANDEZ, 2006). Estudos observacionais têm demonstrado associação entre os polimorfismos no *VDR* e susceptibilidade ao desenvolvimento do DM1 (MOTOHASHI *et al.*, 2003; TIZAOUI *et al.*, 2014), DM2 (OH; BARRETT-CONNOR, 2002), intolerância à glicose, resistência à insulina, secreção de insulina e níveis de calcitriol (UITTERLINDEN *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem claramente que *VDR* é um gene candidato para o risco em desenvolver diabetes, e seus polimorfismos podem desempenhar um papel na patogênese da doença, influenciando a capacidade de secreção de células beta.

O gene que codifica o receptor da vitamina D (*VDR*) em humanos está localizado no cromossomo 12q13.11 (Figura 7). O gene *VDR* é composto por oito *éxons* codificantes (*éxons* 2 – 9) e seis *éxons* não traduzidos que estão sob splicing alternativo (*éxons* 1a – 1f), oito *íntrons* e duas regiões promotoras (NEJENTSEV *et al.*, 2004). Compreende uma região genômica de 63.495 pares de bases (pb) e suas variantes alélicas têm sido associadas com a patogênese do diabetes em diferentes populações (CHAKHTOURA; AZAR, 2013; FREDERIKSEN *et al.*, 2013).

Vários polimorfismos foram identificados em vários *introns* e *exons* do gene *VDR* e são supostamente associados com alterações nas concentrações circulantes de vitamina D ativa e sua expressão gênica medidas *in vitro* (MORRISON *et al.*, 1992).

FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE *VDR* NO CROMOSSOMO.



Mapa do gene *VDR* e principais variações genéticas. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *VDR* mais frequentes estão representados, com destaque em vermelho para as regiões estudadas neste trabalho. O gene *VDR* está localizado no cromossomo 12, na região q13.11.

FONTE: Adaptado (COLAGAR; FIROUZJAH; HALALKHOR, 2015).

São conhecidos atualmente mais de 25 polimorfismos distintos presentes no locus *VDR*, onde a maioria está localizada próximo da extremidade 3' do gene (UITTERLINDEN *et al.*, 2004). Segundo Manzon e colaboradores (2014), o gene apresenta quatro polimorfismos di-alélicos bem caracterizados: *BsmI* (A>G, rs1544410), *ApaI* (A>C, rs7975232), *FokI* (C>T, rs10735810 ou rs2228570) e *TaqI* (T>C, rs731236), sendo *ApaI*, *BsmI*, e *FokI* os SNPs mais comuns (BAAN *et al.*, 2004). Os polimorfismos *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232), e *TaqI* (rs731236) estão localizados na posição 3'- terminal do gene *VDR*, e são SNPs ligados uns aos outros por ligações de baixa estabilidade e são considerados polimorfismos silenciosos, não alterando a sequência de aminoácidos da proteína codificada. Estes SNPs não afetam a

estrutura proteica, mas podem afetar a expressão gênica através da regulação da estabilidade do mRNA ou podem estar em elevado desequilíbrio de ligação com outros SNPs funcionais (JURUTKA *et al.*, 2001). Já o polimorfismo localizado no *éxon 2*, reconhecido pela enzima de restrição *Fok I* (rs10735810 ou rs2228570), modifica a estrutura da proteína *VDR* devido a uma alteração no códon de início da tradução (HAUSSLER *et al.*, 1998). Outros polimorfismos no gene *VDR* são caracterizados pela variação alélica em sítios de enzimas de restrição: *Tru9I*, *TaqI*, *EcoRV* e *ApaI*, todos localizados entre os *exons 8 e 9* (NAITO *et al.*, 2007).

Em um estudo de meta-análise, foi investigada a associação entre polimorfismos no gene *VDR* e risco de DM1, e o polimorfismo *BsmI* foi associado com um risco significativamente aumentado na população asiática. Portadores do alelo B variante *BsmI* (BB ou Bb) apresentaram um risco 30% maior de DM1 quando comparados com os portadores homocigotos bb. Já os polimorfismos em *Fok I*, *Apa I*, e *Taq I* não pareceram ter associação com DM1 em europeus, asiáticos e latinos (ZHANG *et al.*, 2012).

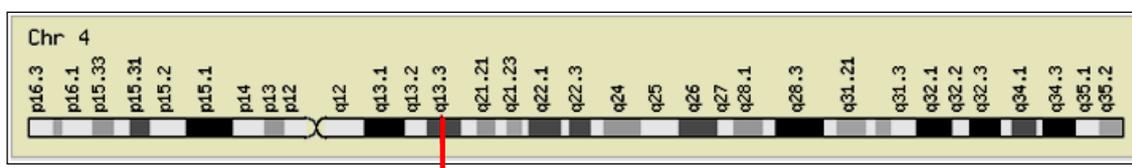
O polimorfismo em estudo, rs10735810 ou rs2228570 está localizado no *éxon 2* (c.2 C>T, p.Met1Thr) do cromossomo 12q.13.11 (Figura 7) na região 5'-terminal do gene *VDR*. O alelo T ou "f" cria um códon de iniciação alternativo ATG que altera o códon de início da tradução, resultando em uma variante de proteína mais longa (427 aa), ou seja, uma proteína *VDR* com 3 aminoácidos a mais que a selvagem (424 aa) (alelo C). Estudos funcionais mostraram que a versão mais longa da proteína apresenta menor atividade transcricional, sendo menos eficaz na transativação gênica (FREDERIKSEN *et al.*, 2013; MORAN-AUTH; PENNA-MARTINEZ; BADENHOOP, 2015). Esta substituição alélica não só afeta a função da vitamina D como também interrompe a eficiência de ligação com seu receptor hormonal *VDR*, prejudicando os mecanismos de liberação/secreção da insulina (YU *et al.*, 2016). Este polimorfismo demonstrou ter papel funcional na ativação da transcrição gênica (WHITFIELD *et al.*, 2001).

O polimorfismo rs731236 (c.1056 T>C, p.Ile352Ile), localizado no *éxon 9* do gene *VDR*, é uma variação sinônima no códon 352, e esta substituição T>C não altera a sequência de aminoácidos (p.Ile352Ile) (CAKIR *et al.*, 2016).

### 3.8.2 Gene *DBP*

O gene que codifica a proteína *DBP* em humanos está localizado no braço longo do cromossomo 4q13.3 (Figura 8), compreendendo uma região genômica de aproximadamente 35 kb. Possui 13 *exons* e 12 *introns* e codifica um polipeptídeo de cadeia única com 474 resíduos de aminoácidos que consiste em 3 domínios, sendo este, expresso em uma grande variedade de tecidos humanos (CHRISTIANSEN *et al.*, 2007).

FIGURA 8 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE *DBP* NO CROMOSSOMO.



O gene *DBP* está localizado no cromossomo 4, na região q13.3 (traço em vermelho).  
 FONTE: GENECARDS Human Gene Databases, 2017.

A estrutura do cDNA da *DBP* foi inicialmente reportado em humanos, e posteriormente em camundongo, coelho, tartaruga e, mais recentemente, na galinha (WHITE; COOKE, 2000).

A proteína ligadora da vitamina D (*Vitamin D binding protein* - DBP), também conhecida como globulina de grupo específico (*group specific component* - Gc), é a principal transportadora de vitamina D e seus metabólitos no plasma. Pertence à uma família de multigenes que inclui a albumina,  $\alpha$ -fetoproteína e  $\alpha$ -albumina/afamina, e é predominantemente sintetizada no fígado.

Além da sua capacidade específica de ligação ao esteroide, a DBP exerce outras funções biológicas importantes, como a eliminação de actina, o transporte de ácidos graxos, a ativação de macrófagos e a quimiotaxia (WHITE; COOKE, 2000). Menos de 5% da DBP circulante é realmente complexada com metabólitos da vitamina D, concedendo uma quantidade considerável da proteína circulante para estas funções complementares (OTTERBEIN *et al.*, 2002).

A DBP é uma glicoproteína com massa molecular que varia entre 52 a 59 kDa, altamente polimórfica, com mais de 120 variantes alélicas já descritas (SPEECKAERT *et al.*, 2006).

Dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) não sinônimos têm sido bem caracterizados no gene *DBP*, e ambos podem influenciar o metabolismo da vitamina D (FU *et al.*, 2009; FU *et al.*, 2016). Ambos localizados no *exon* 11, o polimorfismo p.T436K (anteriormente T420K, NCBI rs4588) consiste em uma substituição C (citosina) para A (adenina) [treonina (ACG) para lisina (AAG)] e o polimorfismo p.D432E (anteriormente D416E, NCBI rs7041), que resulta em uma substituição T (timina) para G (guanina) [aspartato (GAT) para glutamato (GAG)] (BRAUN; BICHLMAIER; CLEVE, 1992)

A combinação destes dois polimorfismos dá origem a três principais variantes (ou isoformas) eletroforéticas, que se distinguem pela sua composição de aminoácidos e padrões de glicosilação, são elas: Gc-1f, GC-1s e Gc-2. Gc-1f é o alelo do tipo selvagem e se dá pela combinação de ácido aspártico na posição 432 e treonina na posição 436; Gc-1s é uma combinação de ácido glutâmico na posição 432 e treonina em 436; e Gc-2, a combinação de ácido aspártico na posição 432 e lisina na posição 436 (CHRISTIANSEN *et al.*, 2007). As duas variantes nas posições 432 e 436 estão em forte desequilíbrio de ligação (KLUPA *et al.*, 1999), e a combinação de glutamato na posição 432 e lisina em 436 é muito raramente observada em populações humanas (GOZDZIK *et al.*, 2011).

Independente de nossa compreensão das vias metabólicas da vitamina D, incluindo sua capacidade de modular o sistema imune (HOLICK, 2007), a relação causal entre alterações nos constituintes da via da vitamina D e o desenvolvimento do DM1 permanecem incertos. Isto é atribuído principalmente à natureza intrincada dos processos metabólicos da vitamina D, bem como aos amplos efeitos biológicos exibidos pelos seus componentes. Assim, a compreensão da influência da via da vitamina D na patogênese do DM1 requer um exame sistemático sobre os diferentes papéis de seus vários componentes.

Além disso, tem sido sugerido que fatores ambientais poderiam ser capazes de alterar a penetrância dos principais genes de susceptibilidade ou capazes de aumentar a penetração de genes de baixo risco, desempenhando um papel no desencadeamento de auto-imunidade e desenvolvimento do DM1

(BARBEAU, 2012) e que diferentes grupos étnicos possam apresentar predisposições genéticas únicas ao desenvolvimento do DM1 (THOMAS; PIETROPAOLO, 2010).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde e foi aprovado sob o Protocolo CAAE 01038112.0.0000.0102 (ANEXO1).

##### **4.1 AMOSTRAS**

Amostras de soro e sangue total de 281 indivíduos adultos ( $\geq 18$  anos), classificados em diabéticos tipo 1 ( $n=136$ ) e saudáveis (grupo controle,  $n=145$ ), foram estudados.

As amostras dos portadores de DM1 foram coletadas durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR (SEMPR), onde foram livres a participar ou não através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras dos pacientes saudáveis (controles) foram obtidas do banco de sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR).

Os dados antropométricos e clínicos foram obtidos de todos os participantes através de entrevista (grupo controle e diabéticos) e dados do prontuário (diabéticos).

Foram coletadas amostras de sangue total (BD Vacutainer® K<sub>2</sub>EDTA; Becton, Dickinson, Co.) para extração do DNA cromossomal e determinação da hemoglobina glicada e amostras de soro (Tubo Gel BD Vacutainer® SSTTM; Becton, Dickinson, Co.) para determinação dos parâmetros bioquímicos.

Para a obtenção do soro dos pacientes, os tubos com gel separador foram centrifugados (Centrífuga Hermle Z206A) por 10 minutos a 6.000 rotações por minuto (rpm) e alíquotas de soro (~1,5 mL) foram estocadas em

freezer -20 e -80°C, para posterior determinação dos parâmetros bioquímicos. As amostras de sangue total, coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTAK<sub>2</sub> foram homogeneizadas por 15 minutos e divididas em duas frações: uma para a determinação da hemoglobina glicada - HbA1C (alíquota ~1,0 mL); e outra centrifugada (Hermle Z326K) para obtenção do *buffy coat* (camada de leucócitos) e posterior extração do DNA cromossomal. Estas amostras fazem parte do Biorrepositório do Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, homologado pela Portaria Nº 2.201, de 14 de setembro de 2011. Amostras hemolisadas, lipêmicas e ictéricas foram excluídas de todos os ensaios.

#### 4.1.1 Critérios para a caracterização da amostra

Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos foram:

- a) Grupo *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1): pacientes (homens e mulheres) portadores de diabetes tipo 1 com idade maior que 18 anos, que foram diagnosticados após 18 anos de idade.
- b) Grupo Controle (CTRL, indivíduos saudáveis): homens e mulheres com idade maior ou igual a 35 anos e menor ou igual a 57 anos para parear com pacientes diabéticos tipo 1.

Critério de exclusão: pacientes com diagnóstico de DM1 antes dos 18 anos não foram incluídos no estudo.

A presença de diabetes foi determinada segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2017) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2016), apresentadas no Quadro 1 desta dissertação.

## 4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico, obtido de leucócitos, foi extraído pelo método de *salting out*, onde as proteínas celulares sofrem desidratação e precipitam quando submetidas a um ambiente salino saturado de cloreto de sódio. A

escolha do método recai na sua eficiência, rapidez, segurança e economia (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280 nm (*NanoDrop*®, *Thermo Scientific*), sendo critério de exclusão amostras com concentração inferior a 20 ng/μL e/ou razão  $A_{260}/A_{280}$  menor que 1,7 ou superior a 2,1, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra. Todas as amostras de DNA foram diluídas, sendo normalizadas na concentração final de 100 ng/μL, com água ultrapura estéril para análises de genotipagem pelo sistema PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Para as análises com o sistema *TaqMan*®, as amostras foram diluídas até a concentração final de 20 ng/μL em água ultrapura estéril. Ambas foram conservadas em *freezer* a -20°C.

#### 4.3 VARIABILIDADES GENÉTICAS EM ESTUDO

O Quadro 4 apresenta os genes e os polimorfismos genéticos estudados neste trabalho.

QUADRO 4 – CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.

Designação OMIM	Cromossomo Posição	Localização Região	Genes	Polimorfismos	Técnica
601769	12q13.11	<i>Exon 2</i>	<i>VDR</i>	rs2228570 C>T	<i>TaqMan</i> ® C_12060045_20
601769	12q13.11	<i>Exon 9</i>	<i>VDR</i>	rs731236 T>C	<i>TaqMan</i> ® C_2404008_10
139200	4q13.3	<i>Exon 11</i>	<i>DBP</i>	rs4588 C>A	PCR-RFLP Enzima <i>Sfy</i> I
139200	4q13.3	<i>Exon 11</i>	<i>DBP</i>	rs7041 T>G	PCR-RFLP Enzima <i>Hae</i> III

rs: dbrs: reference SNP database

OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man®. Enzima de restrição

FONTE: (NCBI, 2016; OMIM, 2016).

#### 4.4 GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS EM ESTUDO

As genotipagens dos polimorfismos rs2228570 e rs731236 foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, utilizando o equipamento 7500 Fast™ (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*)

utilizando o método de PCR em tempo real (qPCR) com sondas fluorescentes específicas do sistema *TaqMan*® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os reagentes (do fabricante do equipamento (*Applied Biosystems*)).

O sistema com sondas *TaqMan*® utiliza dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos (*forward e reverse*) para amplificar a região polimórfica em estudo. Em paralelo duas sondas marcadas com os fluoróforos VIC e FAM, ligados a uma molécula de *quencher*, cada uma específica para interagir com um alelo do sítio polimórfico. Enquanto a sonda não for clivada não há emissão de fluorescência devido à presença de uma molécula *quencher* (supressor de fluorescência). Quando os *primers* se anelam em região específica do DNA molde e ocorre início da transcrição a ação exonuclease (5'->3') da DNA polimerase, cliva a sonda, liberando o fluoróforo do *quencher* o que permite a emissão de fluorescência. Sendo a fluorescência distinta para os dois alelos, o padrão de fluorescência identificado permite identificar o genótipo.

As reações, em placas de 96 poços, foram realizadas sob câmara de fluxo laminar seguindo o protocolo mostrado no Quadro 5. Em cada placa foram utilizados dois poços como controle negativo (NTC, *negative template control*), contendo apenas o Super Master Mix (*MasterMix*® + *SNP GenotypingAssay*® + água ultrapura estéril). As amostras DM1 e CTRL foram distribuídas aleatoriamente na mesma placa.

Para todas as análises, a qualidade da genotipagem identificada pelo software do sistema 7500 Fast™ foi superior a 98%, excluindo, portanto, a necessidade de investigação de fontes de baixa eficiência na PCR e/ou repetição das análises.

QUADRO 5 – PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM SONDAS FLUORESCENTES POR PCR EM TEMPO REAL.

REAGENTES	VOLUMES (Volume final 8,0 µL)
Master Mix® (2x)	3,0 µL
SNP Genotyping Assay® (40x)	0,1 µL
Água ultrapura estéril	1,9 µL
DNA molde (20 ng/µL)	3,0 µL
CICLAGEM	TEMPERATURA → TEMPO (segundos)
1 ciclo	60°C → 30 s (pré-PCR)
1 ciclo	95°C → 600 s (ativação polimerase)
50 ciclos	95°C → 15 s (desnaturação)
	60°C → 90 s (anelamento/extensão)
1 ciclo	60°C → 30 s

*Master Mix*®: sistema de reação composto pela DNA polimerase, Mg<sup>++</sup>, tampão e ativadores, otimizado para uso com sondas *TaqMan*®. *SNP Genotyping Assay*®: sondas fluorescentes específicas para genotipagem com os fluoróforos VIC® e FAM™.

As genotipagens dos polimorfismos rs4588 e rs7041 foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, através da técnica de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando as enzimas de restrição *Hae* III (Invitrogen™) para os polimorfismos C>A (rs4588) e *Sty* I (New England BioLabs) para o polimorfismo T>G (rs7041).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar o fragmento de 483 pares de base (pb) foram: forward 5'-AAATAATGAGCAAATGAAAGAAG-3' e reverse 5'-CAATAACAGCAAAGAAATGAGTA-3', conforme descritos por Li, et al. (2011). As condições de PCR utilizadas para ambas as amplificações estão descritas no Quadro 6.

QUADRO 6 – PROTOCOLO UTILIZADO NA TÉCNICA PCR-RFLP PARA GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS rs4588 E rs7041 DO GENE *DBP*.

<b>Oligonucleotídeos iniciadores (Primers)</b>	<i>forward</i> 5'-AAATAATGAGCAAATGAAAGAAG-3' <i>reverse</i> 5'-CAATAACAGCAAAGAAATGAGTA-3'	
<b>REAGENTES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO FINAL</b>	<b>VOLUMES</b>
Água Milli-Q estéril	-	12,6 µL
Tampão [10X]*	1X	2,0 µL
Primer F [10 pmol/µL]	0,5 pmol	1,0 µL
Primer R [10 pmol/µL]	0,5 pmol	1,0 µL
dNTP [5 mM]	0,2 mM	0,8 µL
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,5 mM	1,2 µL
Taq [5 U/µL]*	0,1 U	0,4 µL
DNA template [100 ng/µL]	100 ng	1,0 µL
Volume final	-	20,0 µL
<b>CICLOS TÉRMICOS</b>	<b>TEMPERATURA → TEMPO (segundos)</b>	
1 ciclo	95°C → 240 s	
35 ciclos	95°C → 40 s	
	55°C → 30 s	
	72°C → 60 s	
1 ciclo pós-PCR	72°C → 600 s	

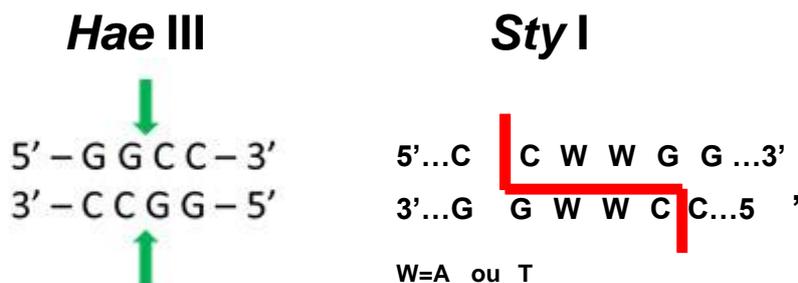
\*Tampão TAQ 10X, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 750 mM, Tris-HCl (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20.

FONTE: o autor, 2017.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Biocycler (Biosystems). A qualidade da reação de PCR foi verificada com eletroforese em agarose a 1,5%. Uma alíquota de 2 µL do produto de PCR, adicionada de 3 µL de tampão de aplicação (glicerol 30%; azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%) foi aplicada no gel. A mistura foi submetida à eletroforese submarina com voltagem constante (60 Volts; ~22 mA), em tampão TBE 1x (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2), a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. Em seguida, os produtos de PCR foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz UV (302 nm), e as imagens obtidas com o sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia).

Após a amplificação, o produto de PCR do rs7041 e rs4588 foram digeridos com as enzimas de restrição *Hae*III e *Sty*I, respectivamente e ambos foram incubados a 37°C durante 1 h (Figura 9).

FIGURA 9 – SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENDONUCLEASES.



As setas verdes e linhas vermelhas indicam os sítios de clivagem das endonucleases *Hae* III e *Sty*I, respectivamente.

FONTE: O autor, 2017.

O protocolo para a reação de restrição está descrito no Quadro 7.

QUADRO 7 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs4588 E rs7041.

REAGENTES	VOLUMES	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água Milli-Q estéril	6,9 µL	-
Tampão [10X]*	1,0 µL	1X
Enzima de restrição [10 U/µL]	0,1 µL	1 U
Produto de PCR (~20 ng/µL)	2,0 µL	~4 ng
Volume final de reação	10,0 µL	-

\*Anza™ 10X *Buffer* para enzima de restrição *Haell*III: fórmula patenteada pelo fabricante; e *NEBuffer*™ 10X para enzima de restrição *Sty*I: 100 mM, Tris-HCl (pH 7,9; 37°C); 500 Mm NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM Dithioerythritol.

FONTE: O autor, 2017.

Os fragmentos de DNA resultantes das reações de restrição foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em cuba mini Protean 3, Bio Rad (100x75x0,75 mm). Ao volume total da mistura de restrição foi adicionado 3 µL de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol) e aplicado no gel de poliacrilamida e

visualizada em transiluminador sob luz UV (302 nm) e fotodocumentado com sistema L.PIX (Loccus).

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

As dosagens bioquímicas incluíram marcadores de função renal (ureia, creatinina e ácido úrico), perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicérides), controle glicêmico (glicemia de jejum, hemoglobina glicada – HbA1C e 1,5-anidroglicitol (1,5AG), proteínas totais e albumina.

Para as amostras do grupo controle, os biomarcadores foram quantificados no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest Diagnóstica SA) utilizando reagentes, calibradores e controles adequados ao sistema automatizado. As amostras de soro foram descongeladas e homogeneizadas por 30 minutos antes de serem dosadas. Para as amostras do grupo DM1, os biomarcadores foram dosados no Hospital de Clínicas da UFPR, em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Diagnóstica Laboratórios do Brasil) empregando-se reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante. Os princípios dos métodos utilizados estão descritos no Quadro 8.

QUADRO 8 – CARACTERÍSTICAS DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES EM ESTUDO.

<b>Analito</b>	<b>Princípio do Método</b>	<b>CVa %</b>	<b>Intervalo de Referência</b>
<b>1,5 anidroglicitol</b>	Enzimático colorimétrico Glycomark	3,4	>10 µg/mL
<b>Ácido úrico</b>	Colorimétrico Uricase/Peroxidase - Trinder	1,6	2,5 – 7,0 mg/dL
<b>Albumina</b>	Reação com verde de bromocresol	1,9	3,3 – 4,7 g/dL
<b>Colesterol Total*</b>	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	2,0	Desejável: <190 mg/dL
<b>Creatinina</b>	Picrato alcalino cinético	3,2	0,5 – 1,4 mg/dL
<b>Glicose</b>	Hexoquinase UV	1,9	60 – 99 mg/dL
<b>HbA1C</b>	Imunoturbidimétrico	0,8	4,0 – 6,0%
<b>HDL-colesterol*</b>	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	3,5	Desejável ≥ 40
<b>LDL-colesterol**</b>	Cálculo pela equação de Friedewald		Ótimo: <100 mg/dL Limiar ótimo: 100 – 129 mg/dL Limiar elevado: 130 – 159 mg/dL Elevado: 160 – 189 mg/dL Muito elevado: ≥ 190 mg/dL
<b>Proteínas Totais</b>	Reação de Biureto	2,4	6,0 – 8,0 g/dL
<b>Triglicérides</b>	Ensaio enzimático com lipase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase com Reação de Trinder	1,9	Desejável: <150
<b>Ureia</b>	Ensaio cinético UV com urease, GLDH e NADH.	1,9	15 – 45 mg/dL

CVa, coeficiente de variação analítica interensaio, em porcentagem, para soro controle com concentração “normal”. \*Atualização Diretriz, 2017. \*\*V Diretriz, 2013.

\*\*Equação de Friedewald, LDL-colesterol = colesterol total – HDL-colesterol – Triglicérides/5.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis contínuas foram analisadas para normalidade com o teste de *Kolmogorov-Smirnov* e a presença de *outliers* foi realizada pelo método gráfico disponível no programa *Statistica* para *windows* 10.0 (*StatSoft Inc, Tulsa OK, USA*). As variáveis com distribuição normal foram representadas pela média  $\pm 1SD$  (1-desvio padrão) e as sem distribuição normal pela mediana (intervalo interquartil, 25%-75%).

As variáveis discretas foram comparadas com o teste de *Chi-quadrado* ( $\chi^2$ ). Para as análises de correlação, o modelo descrito por *Pearson* (correlação linear) foi utilizado.

As variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste “t” de *Student* bidirecional para amostras não pareadas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal passaram por transformação logarítmica ou analisadas pelo teste *U* de *Mann-Whitney*, conforme apropriado. Para os ensaios de correlação e associação utilizando ANOVA, os polimorfismos em estudo foram codificados como 1 (homozigoto usual), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro).

A verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, cálculos das frequências genotípicas e alélicas, bem como o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência (AMF) foram realizados com o programa *DeFinetti* (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

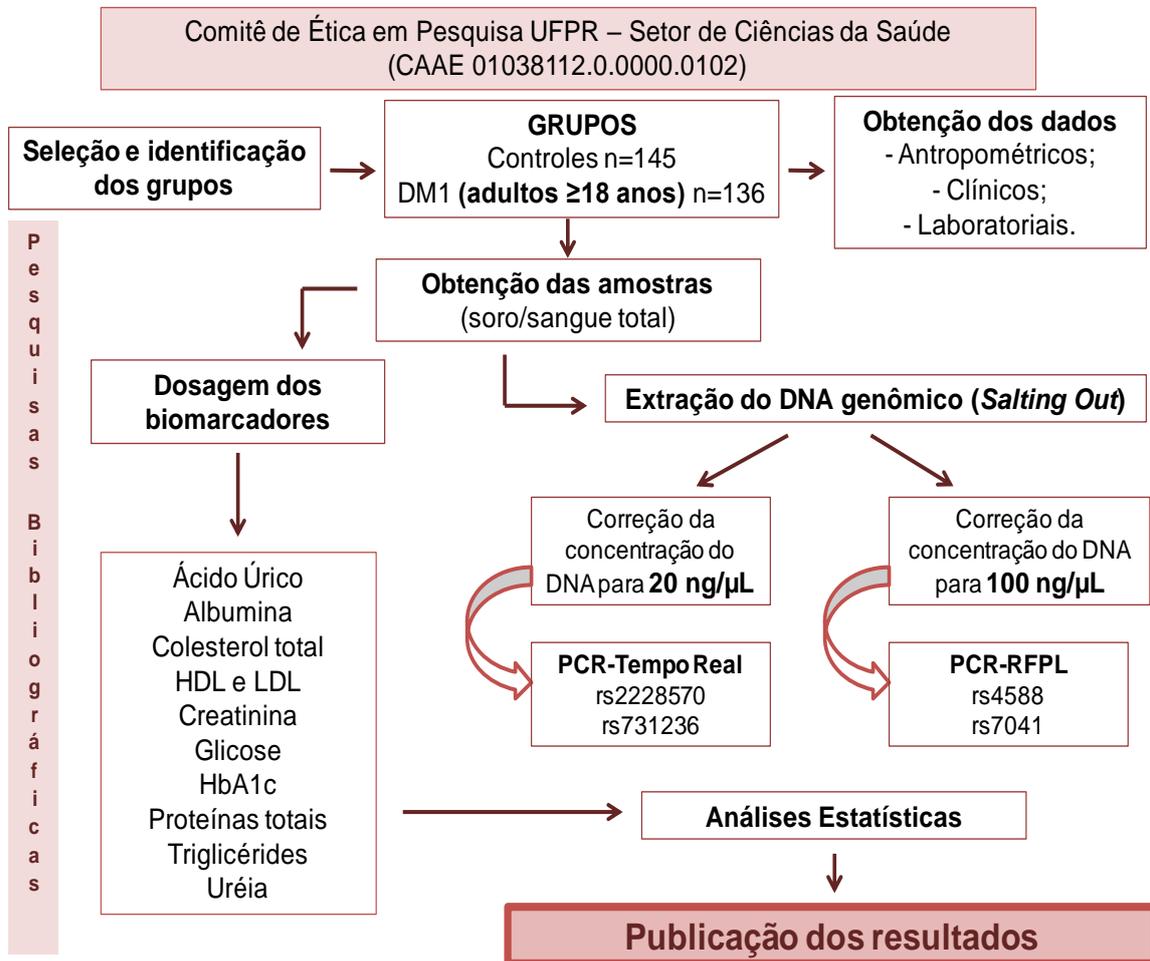
Para as comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado similar quando estava dentro do limite de 95% do intervalo de confiança. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes.

Uma probabilidade inferior a 5% ( $P < 0,05$ ) foi considerada significativa em todas as análises.

#### 4.7 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

O fluxograma de trabalho, com as principais etapas do projeto, está representado na Figura 10.

FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.



FONTE: O autor, 2017.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos e clínicos para os grupos controle e DM1 em estudo é apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS DE ADULTOS DM1 E CONTROLES SAUDÁVEIS.

Parâmetros	Controle (n=145)	DM1 (n=136)	P
Idade (anos)	44 ± 5	43 ± 12	0,241
Gênero (H/M)	50/95	45/91	0,805
Peso (kg)	74,5 ± 13,7	72,3 ± 17,1	0,249
Altura (m)	1,66 ± 0,089	1,63 ± 0,098	0,023
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,9 ± 4,3	25,9 ± 4,3	0,051
Etnia, %			
Euro-Brasileiro	ND	79,5	-
Afro-Brasileiro	ND	19,8	-
Tempo de DM1 (anos)	ND	16,1 ± 10,4	-
Doença tireoidiana, %	ND	34,5	-
Dislipidemia, %	ND	39,7	-
Hipertensão, %	ND	47,8	-
Tabagismo, %	ND	42,6	-
Doença arterial coronariana (DAC), %	ND	25,7	-
Uso de hipolipemiantes, %	ND	35,3	-
História familiar de diabetes, %	ND	68,4	-
Retinopatia, %	ND	14,7	-
Neuropatia, %	ND	5,1	-
Infarto agudo do miocárdio (IAM), %	ND	7,9	-

H, homens; M, mulheres, DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; Controle, adultos saudáveis; IMC: Índice de Massa Corporal; ND: dado não disponível; Tempo em anos que o paciente apresenta DM1. Os valores são média±1-Desvio Padrão para variáveis com distribuição normal, mediana (intervalo interquartil, 25%-75%) para variáveis sem distribuição normal. P, probabilidade, teste U de Mann-Whitney; \*teste t-Student bidirecional ou \*\*Chi-quadrado.

Tabagismo, ex-fumantes + fumantes

-, sem informação disponível

FONTE: O autor (2017)

### **Sexo, Idade e Etnia**

Ambos os grupos foram pareados por gênero e idade, (Tabela 1). Embora o índice de massa corporal (IMC) não diferencie ( $P=0,051$ ) os grupos deste estudo, é esperado, usualmente, que o grupo DM1 apresente IMC menor, quando comparado ao grupo controle, uma vez que os indivíduos com a patologia geralmente apresentam redução de peso (KAMINSKI *et al.*, 2013). O emagrecimento rápido é também um sintoma clássico associado ao diagnóstico do DM1 (ADA, 2017; SBD, 2016). Para o estudo em tela, a seleção da amostra, com pareamento por gênero e idade, promoveu a alteração da lógica esperada, caso uma seleção aleatória fosse realizada.

A mediana de tempo de diabetes de 16,1 anos, caracteriza o grupo DM1 como submetido à deficiência de insulina por logo prazo, e conseqüentemente mais susceptível a complicações associadas à patologia.

O grupo DM1 foi composto por 79,5% de indivíduos Euro-brasileiros, sendo os demais predominantemente Afro-brasileiros. Esta distribuição étnica já era esperada, devido às características raciais da região onde foram obtidas as amostras, na população do sul do Brasil.

### **Histórico familiar de DM**

Entre os pacientes DM1 entrevistados, 68,4% relataram histórico familiar (pais, irmãos ou familiares próximos) positivo para DM1 ou DM2. Vários estudos epidemiológicos revelaram uma associação positiva entre a história familiar de DM e o risco de aparecimento de novos casos tanto de DM1 como de DM2 (CHERNAUSEK *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2016; SWARTLING *et al.*, 2016). Portanto, a amostra em estudo não difere de outros estudos, nacionais e internacionais, com a mesma faixa etária, para o efeito relativo à associação genética.

### **Dislipidemia, DAC, Hipertensão e IAM**

Dos pacientes estudados, 39,7% apresentaram dislipidemia e 35,3% faziam uso de hipolipemiantes, em contraste com um estudo da EURODIAB, onde os resultados indicaram uma prevalência de 51% de adultos diabéticos tipo 1 com perfis lipídicos alterados na população europeia (IDZIOR-WALUS *et al.*, 2001). O perfil lipídico de pacientes com DM1 é altamente dependente do

controle glicêmico (PEREZ *et al.*, 2000). Porém, a prevalência de dislipidemia depende não apenas do grau de controle glicêmico, como também de hábitos alimentares, influências genéticas e prática de atividade física (IDZIOR-WALUS *et al.*, 2001).

Foi reportada doença arterial crônica (DAC) em 25,7% dos pacientes entrevistados. A DAC é a principal causa de mortalidade em pacientes com DM1 e a dislipidemia é um fator de risco bastante significativo para doença, tanto em pacientes DM1 como DM2 (WADWA *et al.*, 2005).

Dos pacientes estudados, 47,8% reportaram sintomas de hipertensão, e 7,9% já haviam sofrido de infarto agudo do miocárdio (IAM), 37,5% deles tomavam medicamentos para tratamento destas complicações.

A hipertensão afeta entre 20 a 60% dos pacientes com diabetes, sendo uma comorbidade extremamente comum da doença. A hipertensão representa um grande fator de risco para eventos cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC), também quanto às complicações microvasculares, pode contribuir para o risco de retinopatia e nefropatia diabética (ARAUZ-PACHECO; PARROTT; RASKIN, 2002).

As características do grupo DM1 em estudo reforçam que o diabetes é um importante gatilho para dislipidemia precoce, e suas principais manifestações como a doença arterial coronariana e o infarto agudo do miocárdio.

### **Retinopatia, Nefropatia e Neuropatia**

Retinopatia e nefropatia são importantes complicações microvasculares que acometem os pacientes diabéticos, principalmente os que apresentam mal controle glicêmico (JAIN; SARRAF; FONG, 2003). A duração da doença é provavelmente o maior preditor para o desenvolvimento e progressão das complicações (FONG *et al.*, 2003).

Os pacientes diabéticos em estudo revelaram frequência de retinopatia de 14,7%. A retinopatia diabética é a causa mais frequente de novos casos de cegueira entre adultos de 20 a 74 anos de idade. Durante as duas primeiras décadas da doença, quase todos os pacientes com DM1 desenvolvem esta complicação (FONG *et al.*, 2003). Entretanto, o rigoroso controle glicêmico ainda tem sido muito eficaz na redução do risco de retinopatia (JAIN; SARRAF;

FONG, 2003). Um estudo de caso-controle realizado pelo Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) demonstrou que o controle glicêmico intensivo em diabéticos tipo 1 resultou em uma diminuição na taxa de progressão da retinopatia. Para os pacientes que não apresentavam a complicação, houve diminuição de aproximadamente 25% no risco, já no grupo que apresentava retinopatia leve a moderada, houve uma redução de aproximadamente 50% na progressão das lesões visuais (Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group, 1995).

A nefropatia diabética está presente em 12,4% dos pacientes estudados (Tabela 1). Apesar das melhorias no controle da pressão arterial e glicêmico em pacientes DM1, a nefropatia diabética (ND) continua sendo a causa mais comum de doença renal crônica no mundo todo. Um grande desafio na prevenção da ND é a incapacidade de identificar pacientes de alto risco em fase inicial (BJORNSTAD; CHERNEY; MAAHS, 2014).

A duração e o grau de hiperglicemia são importantes determinantes das complicações microvasculares no diabetes, incluindo a neuropatia (TESFAYE *et al.*, 2005). No presente estudo, 5,1% dos pacientes diziam sofrer sintomas oriundos desta complicação. A neuropatia diabética afeta aproximadamente 50% dos pacientes com diabetes e é uma das principais causas de morbidade e aumento da mortalidade pela doença. As manifestações clínicas incluem sintomas neuropáticos dolorosos e falta de sensibilidade, o que aumenta o risco de queimaduras, lesões e ulcerações principalmente dos membros inferiores (TESFAYE; SELVARAJAH, 2012). A frequência destas complicações está fortemente associada ao tempo de duração da doença (média de 16,1 anos de doença na população em estudo). Estudos prévios correlacionaram significativamente a incidência dos eventos neuropáticos com o período de diabetes convivido pelo paciente (TESFAYE *et al.*, 2005).

## 5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os resultados das dosagens dos parâmetros bioquímicos são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.

Parâmetros	Controle (n=145)	DM1 (n=136)	P
<b>Glicemia de jejum (mg/dL)</b>	97,5 ± 18,3	192,6 ± 98,2	<0,001
<b>1,5 AG (µg/mL)</b>	23,9 (20,5 – 28,6)	4,2 (2,4 – 5,7)	<0,001*
<b>HbA1C (%)</b>	5,4 (5,3 – 5,6)	8,6 (7,6 – 9,6)	<0,001*
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	174,0 (158,0 – 193,0)	171,0 (152,5 – 198,5)	0,424*
<b>HDL-C (mg/dL)</b>	53,8 ± 13,9	52,5 ± 16,1	0,474
<b>LDL-C (mg/dL)</b>	92,0 (79,5 – 109,0)	98,9 (79,0 – 119,0)	0,130*
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	135,0 (88,0 – 169,0)	91,5 (68,5 – 150,0)	<0,001*
<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	6,8 ± 0,4	8,8 ± 8,1	<0,001
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,9 ± 0,16	4,0 ± 0,4	<0,001
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>	4,6 ± 1,3	4,0 ± 1,6	<0,001
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,56 (0,48 – 0,65)	0,87 (0,80 – 1,0)	<0,001*
<b>Ureia (mg/dL)</b>	23,0 (20,0 – 27,0)	32,0 (25 – 40,0)	<0,001*

Os resultados são apresentados como média±1-Desvio Padrão ou mediana (intervalo interquartil).

P, probabilidade teste t-Student bidirecional.

P\*, probabilidade, teste U de Mann-Whitney.

-, dados não disponíveis.

FONTE: O autor (2017)

### 5.2.1 Marcadores de controle glicêmico (Glicemia, Hemoglobina Glicada e 1,5 anidroglucitol)

A glicemia quantificada no grupo controle foi ao acaso e para o grupo DM1 em jejum. Independente da ausência de jejum para o grupo controle, não foram observadas concentrações de glicose superiores a 99 mg/dL (Tabela 2). As concentrações (mediana) da glicemia em jejum, acima de 180 mg/dL, a HbA1C (>7,5%) e o 1,5AG (<10 µg/mL), indicam que o grupo DM1 em estudo contempla diabéticos com mau controle glicêmico (ADA, 2016; SBD, 2016a).

O presente estudo evidenciou que glicemia sérica em indivíduos diabéticos com DM1, é cerca de duas vezes maior (192,6/97,5) quando comparado aos controles saudáveis (Tabela 2). No presente estudo a média de

HbA1C, de 8,6%, foi semelhante à descrita em estudo multicêntrico na Europa, Japão e Estados Unidos (8,6%) (MORTENSEN; HOUGAARD, 1997), superior à média descrita na Bélgica (6,6%) (DORCHY; ROGGEMANS; WILLEMS, 1997) e inferior à de outros estudos com crianças e adolescentes, realizados na França (8,97%) (ROSILIO *et al.*, 1998). Os dados corroboram a dificuldade destes pacientes em manter a glicemia mais próxima do normal, representando importantes flutuações da HbA1C demonstrado pelo significativo coeficiente de variação observado no grupo DM1 (7,6 – 9,6%).

O monitoramento glicêmico contínuo é importante para estes pacientes, para ajustes nas doses do hipoglicemiante, e visa à prevenção de complicações agudas e crônicas, sendo fundamental no manejo do diabetes (SBD, 2016c).

### 5.2.2 Perfil lipídico

Pacientes DM1 com baixo controle glicêmico estão propensos a anormalidades lipídicas (PETITTI *et al.*, 2007), como apresentado no grupo em estudo (Tabela 2).

Os pacientes DM1 apresentaram concentrações semelhantes ( $P>0.05$ ) de Colesterol total, HDL-C e LDL-C e menores de triglicerídeos quando comparado com o grupo controle.

As concentrações plasmáticas de colesterol total para o grupo DM1 estão dentro do valor limítrofe aceito pela ADA e SBD, não configurando esses pacientes como dislipidêmicos. Já as concentrações de HDL-C estão dentro dos valores de corte desejável para ambos os grupos.

Embora as concentrações plasmáticas de LDL-C no grupo DM1 sejam superiores ao grupo controle (Tabela 2), encontram-se dentro dos intervalos aceitáveis de risco ( $<100$  mg/dL) (ADA, 2016).

Somente as concentrações de triglicérides foram significativamente menores no grupo DM1, quando comparado ao controle ( $P<0,001$ ). Embora em ambos os grupos, as concentrações observadas não estejam associadas à hipertrigliceridemia ( $TG>150$  mg/dL). Uma justificativa plausível para a diferença na concentração dos triglicérides, seria imputá-la, nos diabéticos, a uma dieta mais balanceada e controlada, recomendação importante atrelada

ao tratamento da patologia. Também, não pode ser descartado que o grupo controle teve sua coleta sem jejum prévio, o que pode promover um aumento na concentração de triglicérides, justificando a diferença.

### **5.2.3 Proteínas Totais e Albumina**

Embora as concentrações de proteínas totais e albumina tenham sido significativamente maiores ( $P < 0,01$ ) no grupo com DM1 em relação ao grupo saudável, tanto as concentrações de proteínas totais quanto de albumina se encontraram dentro do intervalo de referência (Tabela 2). Portanto, as concentrações observadas em ambos os grupos não sugerem alterações patológicas ou metabólicas. É possível prever que os grupos em estudo não apresentaram sinais de perda de proteína (proteinúria) ou quadros de carência nutricional (SHIMADA, 2013).

### **5.2.4 Creatinina e Ureia**

Ureia e creatinina séricas são biomarcadores para a avaliação da função renal. Apresentam-se em concentrações elevadas nos quadros de insuficiência renal aguda (IRA) e crônica (IRC). A creatinina é amplamente utilizada para o cálculo da estimativa de filtração glomerular, na triagem de doença renal crônica, sendo mais sensível e específica do que a ureia (K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification, 2002). Na IRC, a creatinina se altera apenas quando mais da metade dos néfrons cessam a sua função, não sendo, portanto, um marcador precoce (LEVEY *et al.*, 2007).

As concentrações de ureia e creatinina foram significativamente ( $P < 0,001$ ) maiores no grupo DM1 (Tabela 2), porém ambas dentro do intervalo de referência, sugerindo que os indivíduos estudados não manifestam complicações de lesão renal. Reconhecidamente o diabetes é fator para desenvolvimento de insuficiência renal, e as concentrações maiores do grupo DM1 talvez sinalizem para uma alteração subclínica indicando evolução para alteração da função renal. Os marcadores ureia e creatinina não tem sensibilidade para uma conclusão assertiva sobre esta hipótese.

### 5.2.5 Ácido úrico

A concentração sérica de ácido úrico foi significativamente menor ( $P < 0,001$ ) em pacientes com DM1 quando comparado ao grupo saudável (Tabela 2). Em concordância com esse resultado foi observado relatos na literatura de que indivíduos com DM1 apresentam concentrações menores de ácido úrico no soro, devido ao aumentado da depuração de urato associado a glicosúria por mecanismo que ainda não está bem elucidado (SHICHIRI; IWAMOTO; SHIIGAI, 1987; ESPARZA MARTIN; GARCIA NIETO, 2011).

## 5.3 ANÁLISES MOLECULARES

As frequências genótípicas e alélicas dos genes para os polimorfismos em estudo (indivíduos DM1 e controle) estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE;  $P > 0,05$ ), evidenciando, sob determinadas condições, que as frequências alélicas na população estudada permanecerão constantes de uma geração à outra. Independentemente de um alelo ser raro ou comum, sua frequência permanecerá a mesma em relação aos outros, desde que essas condições sejam mantidas. Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg podem indicar novas mutações, fluxo gênico entre populações (migração) ou seleção de genótipos para reprodução (NAMIPASHAKI; RAZAGHI-MOGHADAM; ANSARI-POUR, 2015).

### 5.3.1 Polimorfismo rs2228570 do gene *VDR*

As frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo rs2228570 do gene *VDR*, e as comparações entre os grupos são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs2228570 DO GENE *VDR* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Polimorfismo		Controle	DM1	P
Exon 2		(n=145)	(n=136)	
<b>(rs2228570)</b>				0,480
<b>C&gt;T</b>	C/C	49 (33,8%)	55 (40,4%)	
<b>VDR</b>	T/C	78 (53,8%)	64 (47,1%)	
	T/T	18 (12,4%)	17 (12,5%)	
<b>Frequência do Alelo</b>				
	T	39,3	36,0	0,422
	[95% IC]	[34-45]	[30-42]	
<b>Dominante</b>	CC vs TC+TT	49/96	55/81	0,249
<b>Recessivo</b>	TT vs TC+CC	18/127	17/119	0,983

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ .

As frequências genotípicas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ) com  $P>0,05$  para os polimorfismos nos dois grupos.

FONTE: O autor, 2017.

Os grupos em estudo não mostraram diferença nas frequências alélicas ( $P=0,422$ ) e genotípicas para o modelo codominante ( $P=0,480$ ), determinando que o polimorfismo rs2228570 do gene *VDR* não está associado ao DM1 na amostra em estudo, em concordância com outros estudos (GYORFFY *et al.*, 2002; SAN-PEDRO *et al.*, 2005; LEMOS *et al.*, 2008; GOGAS YAVUZ *et al.*, 2011; MOHAMMADNEJAD *et al.*, 2012a), inclusive outro estudo na população Brasileira (MORY *et al.*, 2009).

Embora neste trabalho o rs2228570 não tenha sido associado ao DM1, este polimorfismo já foi fortemente associado na população Turca (KOCABAS *et al.*, 2010), Romena (GUJA *et al.*, 2002) Mediterrânea (PANIERAKIS *et al.*, 2009), Japonesa (BAN *et al.*, 2001) e Espanhola (AUDI *et al.*, 2004).

Há divergência na literatura quanto a associação do polimorfismo rs2228570 com o DM1. Alguns estudos reportam associação que o alelo de risco como T nas populações Italiana (CAPOLUONGO *et al.*, 2006), Japonesa (BAN *et al.*, 2001), e Indiana (ISRANI *et al.*, 2009) e outros estudos com o alelo C nas populações Turca (KOCABAS *et al.*, 2010), e Romena (GUJA *et al.*, 2002). Ainda, foi relatado que o alelo C confere proteção na população Grega

(PANIERAKIS *et al.*, 2009) e risco para nefropatia diabética na população Croata (VEDRALOVA *et al.*, 2012). Audi e colaboradores (2004) reportaram que o alelo T confere proteção para o DM1 em uma população Espanhola.

O polimorfismo rs2228570 foi associado como um preditor significativo na progressão para DM1 em crianças Americanas do Colorado. Neste estudo, o alelo menor (T) mostrou conferir proteção à doença (FREDERIKSEN *et al.*, 2013). Além disso, Abdalah e colaboradores (2014) também documentaram a correlação entre este polimorfismo e susceptibilidade para DM1 em crianças egípcias.

As discrepâncias na associação de polimorfismos do gene *VDR* com DM1 em diferentes populações estudadas parecem ser consequência das diferenças de origem étnica, e interações com outros fatores genéticos ou ambientais envolvidos na patogênese da doença (MOHAMMADNEJAD *et al.*, 2012b).

A Tabela 4 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas deste estudo para o polimorfismo rs2228570 em outras populações.

TABELA 4 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2228570 DO GENE *VDR* COM A LITERATURA.

VDR rs2228570		GENÓTIPOS (%)				Allele (%)
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	CC	TC	TT	T
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	145	33,8	53,8	12,4	39,3 [34-45]
	Pacientes DM1	135	40,4	47,1	12,5	36,0 [30-42]
Turcos (KOCABAS <i>et al.</i> , 2010)	Controles	86	20,9	60,5	18,6	48,9
	Pacientes DM1	90	35,6	63,3	1,1	32,8
República Checa (VEDRALOVA <i>et al.</i> , 2012)	Controles	118	22,1	67,3	10,6	44,2
	Pacientes DM1	54	35,2	46,3	18,5	41,6
HAPMAP-HCB Caucasianos (GYORFFY <i>et al.</i> , 2002)	Han-Chineses	86	18,6	51,1	30,2	44,1
	Controles	103	33	46	20	43
Espanhóis (Navarra) (AUDI <i>et al.</i> , 2004)	Pacientes DM1	107	28	55	17	44
	Controles	116	35	46	19	41,8
HAPMAP-CEU	Pacientes DM1	86	41	52	7	33,1
	Europeus	226	19,4	43,3	37,1	41,1

VDR rs2228570		GENÓTIPOS (%)				Allele (%)
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	CC	TC	TT	T
Portugueses (LEMONS <i>et al.</i> , 2008)	Controles	249	38,9	45,8	15,3	38,2
	Pacientes DM1	207	39,1	48,8	12,1	36,5
Italianos (CAPOLUONGO <i>et al.</i> , 2006)	Controles	246	37	51,7	11,3	37,2
	Pacientes DM1	246	36,2	45,5	18,3	41,1
Espanhóis (Barcelona) (AUDI <i>et al.</i> , 2004)	Controles	275	38	52	10	36
	Pacientes DM1	155	44	44	12	33,5
HAP-MAP-JPT	Japoneses	172	16,2	32,5	51,1	<b>32,5</b>
Brasileiros (MORY <i>et al.</i> , 2009)	Controles	194	49,7	36,7	13,6	<b>32,0</b>
	Pacientes DM1	189	45,2	45,8	9,0	<b>31,9</b>
Espanhóis (SAN-PEDRO <i>et al.</i> , 2005)	Controles	88	46,7	44,3	9,1	<b>31,3</b>
	Pacientes DM1	71	43,7	49,1	7	31,7
Turcos (GOGAS YAVUZ <i>et al.</i> , 2011)	Controles	134	44,8	47	8,2	<b>31,7</b>
	Pacientes DM1	117	52	39,3	8,5	<b>28,2</b>
Iranianos (MOHAMMADNEJAD <i>et al.</i> , 2012b)	Controles	100	55	40	5	<b>25</b>
	Pacientes DM1	87	56,3	37,9	5,7	<b>24,7</b>
Indianos (ISRANI <i>et al.</i> , 2009)	Controles	197	58,9	38,6	2,5	<b>21,8</b>
	Pacientes DM1	236	60,2	33,5	6,4	<b>23,1</b>
Gregos (PANIERAKIS <i>et al.</i> , 2009)	Controles	96	66,7	32,3	1	<b>17,2</b>
	Pacientes DM1	100	50	43	7	<b>28,5</b>
HAPMAP-YRI	Africanos	224	3,5	31,2	65,1	<b>19,2</b>

Em negrito, destacados os dados das amostras em estudo. DM1: diabetes *mellitus* tipo 1.

Comparações em negrito destacam a frequência do alelo menor diferente do Intervalo de confiança de 95% para o grupo controle [95%IC 34-45%]

HAPMAP-CEU: Utah com ascendência na Europa ocidental e do norte; HAPMAP-JPT: Japoneses, Tóquio, Japão. HAPMAP capturado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.

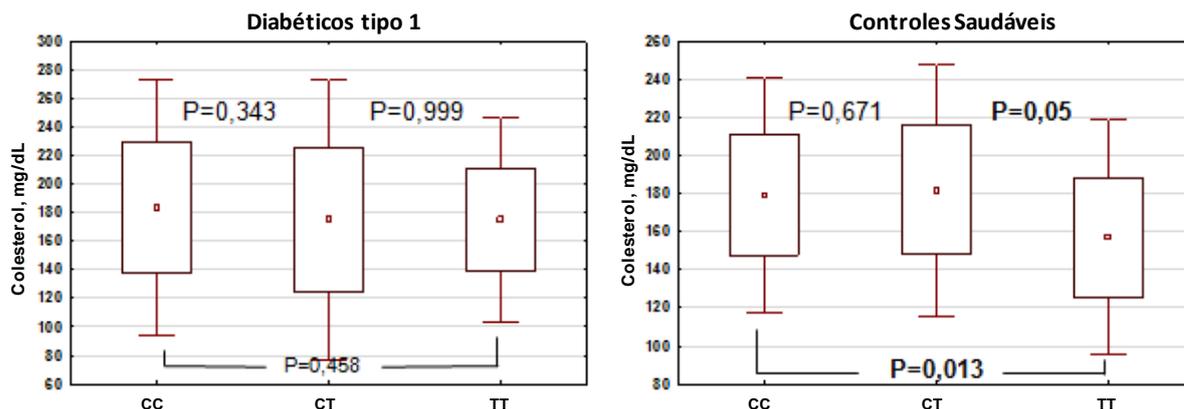
FONTE: O autor, 2017.

A frequência do alelo menor (T) encontrada neste estudo para adultos saudáveis (39,3%), segundo o HapMap foi similar à encontrada em controles saudáveis europeus residentes em Utah (41,1%) e italianos (38,0%), sendo significativamente menor que a encontrada para mexicanos (52,0%) e chineses (48,2%), e maior do que para a população da Nigéria (19,2%) e do Quênia (15,1%) (HapMap, 2017).

A frequência do alelo T no grupo DM1 (36,0%) foi semelhante à encontrada em portugueses (36,5%) e espanhóis (33,5%) (Tabela 4). Estes dados corroboram os valores encontrados no presente estudo, realizado com indivíduos predominantemente Euro-brasileiros.

A associação do rs2228570 com as concentrações dos biomarcadores evidenciou associação entre este polimorfismo e o marcador de perfil lipídico colesterol total (Figura 11).

FIGURA 11 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs2228570 DO GENE VDR COM AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DO COLESTEROL TOTAL PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.



Análise de variância da concentração sérica do colesterol total com os genótipos do polimorfismo rs2228570 do gene VDR.

Os valores são média (quadrado central); 1-desvio padrão (caixa) e 2-desvio padrão (barras verticais).

P, ANOVA, grupo controle (P=0,016) e grupo DM1 (P=0,590)

No interior da figura, comparações entre os genótipos com teste t-Student bidirecional, probabilidade (P) significativa (P<0,05) está destacada em negrito.

Fonte: O autor, 2017.

Na análise dos genótipos com as concentrações dos parâmetros bioquímicos dos pacientes, foi encontrado associação das concentrações plasmáticas de colesterol total do grupo de indivíduos saudáveis com a presença do alelo T, não sendo observada essa associação no grupo DM1 (P=0,458).

Portadores do alelo T (CT+TT) foram associados a uma redução significativa na concentração do colesterol total em cerca de 12,7%, somente no grupo controle (Figura 11).

Embora o mecanismo biológico responsável pela relação entre vitamina D e colesterol é desconhecido, é importante mencionar aqui que a vitamina D e o colesterol possuem o mesmo precursor, 7-desidrocolesterol (7DHC). 7DHC pode ser convertido em pré-vitamina D sob o efeito da radiação UVB e pode servir como substrato para a 7-desidrocolesterol redutase (DHCR7), que catalisa a síntese de colesterol (MAKI *et al.*, 2011; ISLAM *et al.*, 2014). Além

disso, um estudo de cultura celular usando fibroblastos humanos mostrou que a vitamina D inibe a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA), uma enzima chave na via de síntese de colesterol (GUPTA; SEXTON; RUDNEY, 1989). Na presença do DM1, a alteração metabólica gerada pela deficiência crônica de insulina, hormônio relevante para o metabolismo lipídico, pode ter rompido o efeito deste sítio polimórfico sobre o metabolismo do colesterol, inibindo qualquer associação. Novos estudos devem ser conduzidos para confirmar este achado, que pode ser, também, um artefato decorrente do tamanho amostral do nosso estudo.

### 5.2.2 Polimorfismo rs731236 do gene *VDR*

A Tabela 5 mostra os resultados das genotipagens das amostras para o polimorfismo rs731236 do gene *VDR* para os grupos controle e DM1.

TABELA 5 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs731236 DO GENE *VDR* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Polimorfismo		Controle	DM1	P
Exon 9		(n=145)	(n=136)	
<b>(rs731236)</b>				
<b>T&gt;C</b>	T/T	63 (43,4%)	54 (39,7%)	0,056
<b>VDR</b>	C/T	71 (49,0%)	59 (43,4%)	
	C/C	11 (7,6%)	23 (16,9%)	
<b>Frequência do Alelo</b>				
	C	32,1	38,6	0,105
	[95% IC]	[27-37]	[33-44]	
<b>Dominante</b>	TT vs CT +CC	63/82	54/82	0,525
<b>Recessivo</b>	CC vs CT+ TT	11/134	23/113	<b>0,017</b>

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ .

As frequências genotípicas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ) com  $P > 0,05$  para os polimorfismos nos dois grupos.

FONTE: O autor, 2017.

As frequências alélicas ( $P=0,105$ ) e genotípicas ( $P=0,056$ ) não diferiram significativamente entre os grupos (Tabela 5) os modelos codominante e

dominante,  $P=0,056$  e  $P=0,525$ , respectivamente. A análise com o modelo recessivo mostrou significância ( $P=0,017$ ), sugerindo que a presença do alelo C pode estar associada ao risco em relação ao DM1, em concordância com o estudo de Panierakis e colaboradores (2009). Esta associação, caso seja confirmada com estudo de maior tamanho amostral, é fraca, o que pode justificar discrepâncias com outros estudos.

Não foram encontradas evidências estatísticas que apoiassem a associação entre o rs731236 com DM1 em Taiwaneses (CHANG *et al.*, 2000), Chilenos (GARCIA *et al.*, 2007), Espanhóis (SAN-PEDRO *et al.*, 2005), Portugueses (LE MOS *et al.*, 2008), Indianos (ISRANI *et al.*, 2009) e Turcos (KOCABAS *et al.*, 2010; GOGAS YAVUZ *et al.*, 2011). No entanto, já foi demonstrado que este polimorfismo teve associação com DM1 em indivíduos Romenos (GUJA *et al.*, 2002), Iranianos (MOHAMMADNEJAD *et al.*, 2012b) e Coreanos (CHEON *et al.*, 2015) onde a presença do alelo C foi associada ao risco aumentado para DM1 e a presença do alelo T pareceu conferir proteção à doença, o que diverge de nossos resultados. Pani *et al.* (2000) relataram susceptibilidade aumentada para DM1 em alemães que apresentavam combinações alélicas de polimorfismos do gene *VDR*.

A Tabela 6 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas deste estudo para o polimorfismo rs731236 com outras populações.

TABELA 6 – COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs731236 DO GENE *VDR* COM A LITERATURA.

<i>VDR</i> rs731236		GENÓTIPOS (%)				ALELO (%)
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	TT	TC	CC	C
Euro-brasileiros (presente estudo)	Controles	145	43,4	49	7,6	32,1 [27-37]
	Pacientes DM1	135	39,2	43,7	17	38,6 [33-44]
Portugueses (LE MOS <i>et al.</i> , 2008)	Controles	232	19,8	41	39,2	59,7
	Pacientes DM1	205	20	45,9	34,1	57,1
Turcos (GOGAS YAVUZ <i>et al.</i> , 2011)	Controles	134	30,6	49,4	20	44,8
	Pacientes DM1	117	32,5	49	18,5	43,5
HAPMAP-CEU	Europeus	226	22,1	43,3	34,5	43,8

VDR rs731236		GENÓTIPOS (%)				ALELO (%)
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	TT	TC	CC	C
Caucasianos (Hungria) (GYORFFY <i>et al.</i> , 2002)	Controles	103	41	26	31	<b>45</b>
	Pacientes DM1	107	41	32	25	41
Gregos (PANIERAKIS <i>et al.</i> , 2009)	Controles	96	10,4	66,7	22,9	<b>56,3</b>
	Pacientes DM1	100	34	59	7	36,5
Espanhóis (SAN-PEDRO <i>et al.</i> , 2005)	Controles	88	35	49	16	<b>40,3</b>
	Pacientes DM1	71	33,8	50,7	15,5	40,8
Indianos (ISRANI <i>et al.</i> , 2009)	Controles	197	40,6	49,75	9,6	34,5
	Pacientes DM1	236	38,6	47,5	14	37,7
Croatas (SKRABIC <i>et al.</i> , 2003)	Controles	131	36,6	55	8,4	35,9
	Pacientes DM1	134	40,2	41	18,6	39,2
Iranianos (MOHAMMADNEJAD <i>et al.</i> , 2012b)	Controles	100	59	41	0	<b>20,5</b>
	Pacientes DM1	87	36,8	59,8	3,4	33,3
Turcos (KOCABAS <i>et al.</i> , 2010)	Controles	86	44,2	43	12,8	34,3
	Pacientes DM1	90	57,8	31,1	11,1	<b>26,7</b>
Chilenos (GARCIA <i>et al.</i> , 2007)	Controles	203	59,6	34	6,4	<b>23,4</b>
	Pacientes DM1	216	53,2	36,6	10,2	<b>28,5</b>
HAPMAP-YRI	Africanos	226	5,6	47,5	46,8	28,7
HAPMAP-JPT	Japoneses	170	0	23,5	76,4	<b>11,7</b>
Taiwaneses (CHANG <i>et al.</i> , 2000)	Controles	248	94	5,6	0,4	<b>3,2</b>
	Pacientes DM1	157	90,4	9,6	0	<b>4,8</b>
HAPMAP-HCB	Han-Chineses	84	0	2,3	97,6	<b>1</b>

Em negrito, destacados os dados das amostras em estudo. DM1: diabetes *mellitus* tipo 1.

Comparações em negrito destacam a frequência do alelo menor diferente do Intervalo de confiança de 95% para o grupo controle [95%IC 27-37%]

HAPMAP-CEU: Utah com ascendência na Europa ocidental e do norte; HAPMAP-JPT: Japoneses, Tóquio, Japão; HAPMAP-YRI: Yoruba, Ibadan, Nigéria; HAPMAP-HCB: Chineses Han, Beijing, China. HAPMAP capturado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.

FONTE: O autor, 2017.

Considerando o intervalo de confiança (95%IC) para a frequência do alelo C [27 a 37%] em saudáveis (controles) encontrada em nosso estudo, esta foi similar à relatada para Indianos (29,5%) e nigerianos (28,2%); em torno de três vezes maior do que em japoneses (11,8%) e 8 vezes maior do que a encontrada em chineses (4,1%) (HapMap, 2017).

A frequência do alelo menor (C) em pacientes DM1 (38,6%) foi similar as frequências descritas por Györfy e colaboradores (2006) para caucasianos

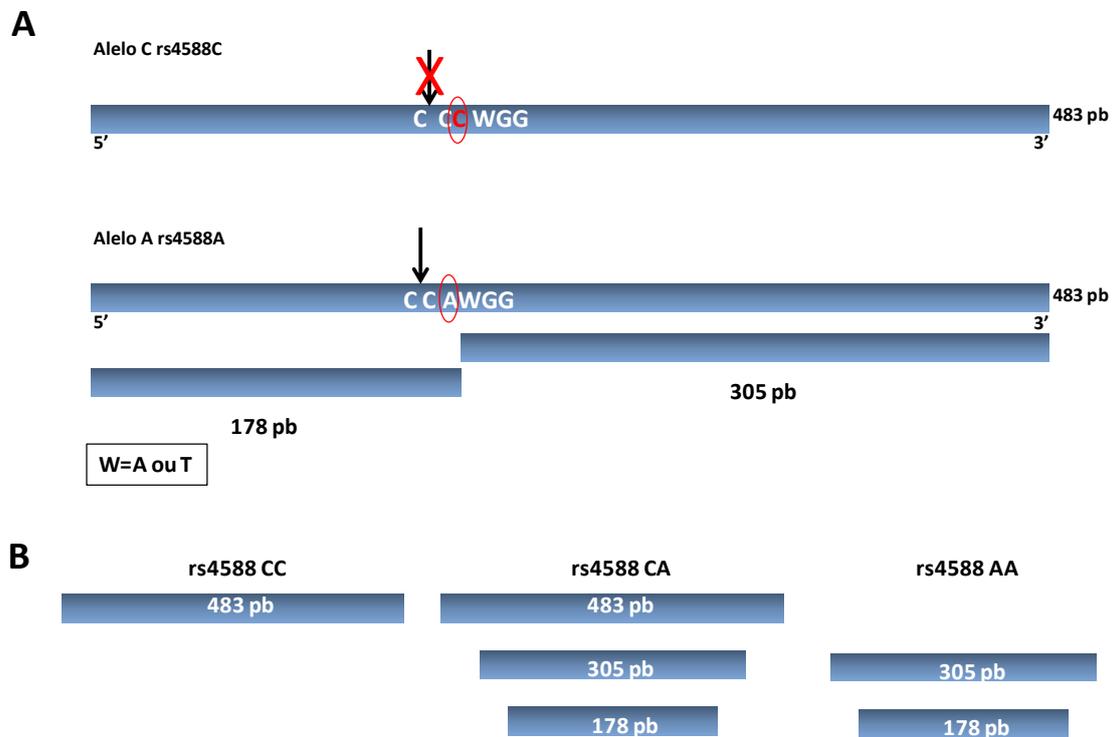
(41%); por Panierakis e colaboradores (2009) para gregos (36,5%) e por San-Pedro e colaboradores (2005) para Espanhóis (40,8%). Frequências significativamente menores foram encontrados por Chang e colaboradores (2000) para Taiwaneses (4,8%), e frequências maiores foram descritos para a população Portuguesa (57,1%) por Lemos e colaboradores (2008).

Nosso estudo não identificou associação entre os genótipos e concentrações dos biomarcadores ou dados clínicos dos pacientes. Os genótipos CT e CC do rs731236 já foram associados, em estudos anteriores, a maiores concentrações de colesterol total ( $p=0,011$ ) e LDL-colesterol ( $p=0,009$ ) na população dos Emirados Árabes. No mesmo estudo, os resultados revelaram que não houve associação significativa entre o rs731236 e o risco para DM2 (SAFAR *et al.*, 2017).

### **5.2.3 Polimorfismo rs4588 do gene *DBP***

A genotipagem do polimorfismo rs4588 foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Read*) e os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *StyI* (conforme descrito no tópico 4.4 de Materiais e Métodos) gerando os perfis de restrição detalhados na Figura 12.

FIGURA 12 – MAPA DE RESTRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA *Sty*I PARA O POLIMORFISMO rs4588.

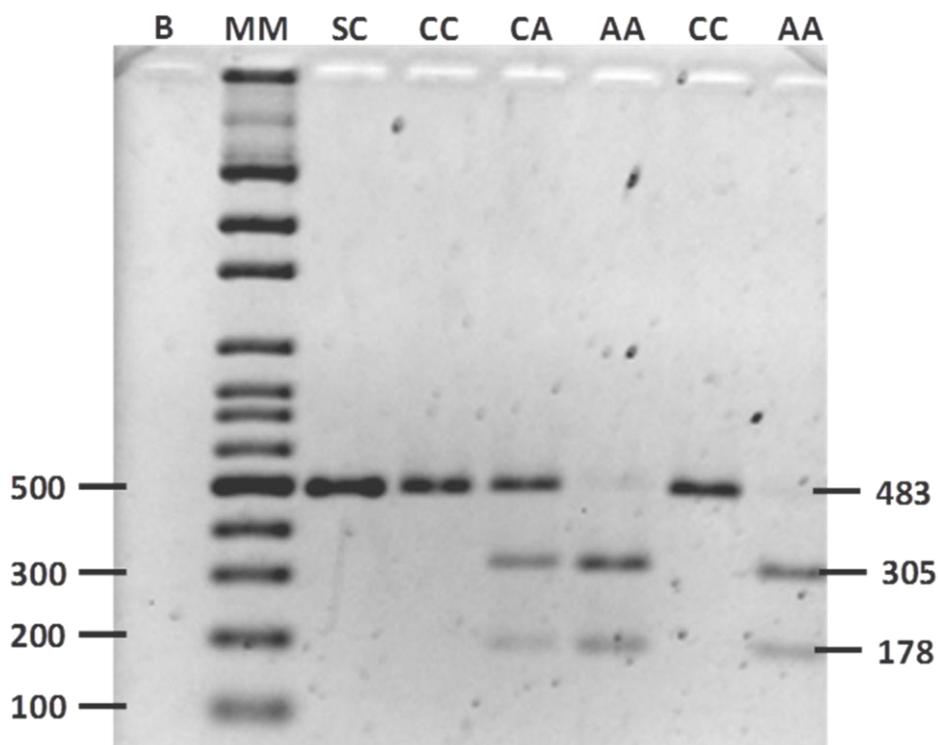


A: MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR (483 pb) DO GENE *DBP*. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Sty*I. O "X" em vermelho simula a ausência do sítio de restrição no alelo selvagem rs4588C. Na presença do alelo C, não há o reconhecimento da enzima pelo sítio de restrição para que ocorra a clivagem, havendo apenas fragmentos com 483 pares de base (pb); na presença do alelo A há reconhecimento da enzima pelo sítio de restrição sendo possível visualizar fragmentos de 178 e 305 pb. B: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs7041 C>A do gene *DBP*. O indivíduo homocigoto CC apresenta um fragmento de 483 pb correspondente ao fragmento gerado pela PCR; o heterocigoto CA apresenta 3 fragmentos (483 pb, 305 pb, e 178 pb) e o homocigoto AA, 2 fragmentos (305 pb e 178 pb).

FONTE: O autor (2017).

Após a etapa de restrição, os géis de agarose a 2% foram analisados quanto a presença dos fragmentos acima descritos. Na Figura 13 é possível observar o perfil de restrição das amostras.

FIGURA 13 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs4588 DO GENE *DBP*.



Eletroforese em agarose 2% (TBE 1X) dos fragmentos de restrição com a enzima *StyI*. Genótipos CC (homozigoto), CA (heterozigoto), AA (homozigoto raro). B: branco da amostra. MM: marcador de massa molecular de 100 pares de base (pb). SC: amostra sem corte. Ao lado direito do gel a massa molecular esperada para os fragmentos de restrição. FONTE: O autor, 2017.

As frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs4588 do gene *DBP*, e as comparações entre os grupos são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs4588 DO GENE *DBP* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n=145)	DM1 (n=136)	P
<b>(rs4588)</b>				0,261
<b>C&gt;A</b>	C/C	78 (53,8%)	65 (47,8%)	
<b>DBP</b>	C/A	53 (36,6%)	62 (45,6%)	
	A/A	14 (9,6%)	9 (6,6%)	
<b>Frequência do Alelo</b>				
	A	27,9	29,4	0,698
	[95% IC]	[23-33]	[24-35]	
<b>Dominante</b>	CC vs CA+AA	78/67	65/71	0,345
<b>Recessivo</b>	AA vs CA+CC	14/131	9/127	0,353

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ .

As frequências genotípicas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ) com  $P > 0,05$  para os polimorfismos nos dois grupos.

FONTE: O autor, 2017.

Os grupos em estudo não mostraram diferença nas frequências alélicas ( $P=0,698$ ) e genotípicas para o modelo codominante ( $P=0,261$ ), determinando que o polimorfismo rs4588 do gene *DBP* não está associado ao DM1 na amostra em estudo. Em concordância com um estudo realizado por Pani e colaboradores (1999) na população Alemã e por Ongagna e colaboradores (ONGAGNA *et al.*, 2001) na população Francesa. Um estudo conduzido no estado da Flórida por Blanton e colaboradores (2011) também reportaram não haver diferença significativa entre as frequências genotípicas e alélicas para as variantes genéticas rs4588 e rs7041 do gene *DBP* em população americana com DM1.

Recentemente, Rahman e colaboradores (2017) relataram em um estudo com população asiática de Bangladesh que, estatisticamente houve associação significativa entre os polimorfismos rs7041 e rs4588 do gene *DBP* e o risco para desenvolvimento de DM2 na população estudada, e que ainda, concentrações insuficientes de vitamina D podem representar risco potencial para o desenvolvimento da doença. No entanto, Wang e colaboradores (2014) mostraram não haver associação significativa entre os polimorfismos do gene *DBP* e DM2 na população caucasiana. Não foram igualmente encontradas evidências para a associação entre os polimorfismos do gene *DBP* e o risco

para desenvolvimento de DM2 em população caucasóide do sudeste da Polônia (MALECKI *et al.*, 2002). Os resultados discrepantes oriundos de estudos com diferentes populações sugerem que a etnia poderia ser possivelmente o fator potencial associado à heterogeneidade da doença (WANG, G. *et al.*, 2014).

A vitamina D tem sido reconhecida por inibir a proliferação dos linfócitos e a expressão do MHC, células CD4, IFN-gama, 1L-2, bem como a produção de imunoglobulinas (PANI *et al.*, 1999). Por ser a proteína de ligação da vitamina D a principal transportadora deste hormônio, era esperado que os polimorfismos no gene *DBP* interferissem na ação da vitamina D e, portanto, pudessem estar associados ao DM1. No entanto, os fatores que levam à associação entre polimorfismos do gene *DBP* e o DM ainda não estão totalmente esclarecidos pela literatura. Alguns mecanismos viáveis seriam de que polimorfismos no gene *DBP* constituíssem um impacto no metabolismo da vitamina D, interferindo na concentração e na atividade deste hormônio sobre as células beta pancreáticas e provocando influências na secreção de insulina. Outra possibilidade seriam os ácidos graxos, como um dos ligantes da DBP, também induzirem anormalidades nas células beta quando presentes em altas concentrações nas ilhotas pancreáticas. Como fator ativador de macrófagos, a DBP também tem papel crítico para o sistema imunológico. Várias citocinas, como o fator de necrose tumoral, poderiam influenciar na sensibilidade à insulina. Outra hipótese seria a de que a associação de polimorfismos no gene *DBP* com o DM não resultem propriamente de variações funcionais no gene *DBP*, mas sim de variações em genes intimamente ligados a *DBP* no cromossomo 4 (WANG, G. *et al.*, 2014).

A Tabela 8 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs4588 com outras populações.

TABELA 8 – COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs4588 DO GENE *DBP* COM A LITERATURA.

<i>DBP</i> rs4588			GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	CC	CA	AA	A
Euro-brasileiros (presente estudo)	Controles	145	53,8	36,6	9,6	27,9 [23-33]
	Pacientes DM1	136	47,8	45,6	6,6	29,4 [24-34]
HAPMAP-GIH	Indianos	176	44,3	47,7	7,9	31,8
Americanos (BLANTON <i>et al.</i> , 2011)	Controles	1801	51,6	40,8	7,7	28,0
	Pacientes DM1	1433	50,4	40,3	9,2	29,4
Chineses (Wang <i>et al.</i> , 2016)	Controles	112	52,7	40,2	7,1	27,2
	Pacientes EIA	156	51,9	35,9	12,2	30,1
Taiwaneses (LEE, S. W. <i>et al.</i> , 2016)	Controles	170	54,7	36,5	8,8	27,1
	Pacientes TB	198	52,5	40,4	7,1	27,3
HAPMAP-CEU	Europeus	224	50,9	44,6	4,5	26,7
Italianos (AGNELLO <i>et al.</i> , 2016)	Controles	92	62,0	29,0	9,0	24,0
	Pacientes MS	100	62,0	32,0	6,0	23,0
Italianos (AGLIARDI <i>et al.</i> , 2017)	Controles	831	53,7	39,8	6,5	26,4
	Pacientes MS	701	54,5	39,4	6,1	25,8
HAPMAP-TSI	Italianos	176	53,4	40,9	5,7	26,1
HAPMAP-MEX	Mexicanos	96	50	47,9	20,8	26,0
HAPMAP-HCB	Han-Chineses	82	56,1	36,6	7,3	25,6
Tailandeses (MANEECHAY <i>et al.</i> , 2015)	Controles	282	61,0	34,4	4,6	21,8
	Pacientes CC	282	61,3	35,8	2,84	20,7
HAPMAP-JPT	Japoneses	170	58,8	38,8	2,3	21,8
HAPMAP-YRI	Africanos	224	92,8	7,1	0	3,6

Em negrito, destacados os dados das amostras em estudo. DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; E: esclerose múltipla; TB: tuberculose; CC: câncer colorretal; EIA: escoliose idiopática no adolescente.

Comparações em negrito destacam a frequência do alelo menor diferente do Intervalo de confiança de 95% para o grupo controle [95%IC 23-33%]

HAPMAP-GIH: Indianos Gujarati em Houston; HAPMAP-CEU: Utah com ascendência na Europa ocidental e do norte; HAPMAP-TSI: Toscanos, Itália; HAPMAP-MEX: Mexicanos com ascendência em Los Angeles, Califórnia; HAPMAP-HCB: Chineses Han, Beijing, China; HAPMAP-JPT: Japoneses, Tóquio, Japão; HAPMAP-YRI: Yoruba, Ibadan, Nigéria. HAPMAP capturado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.

FONTE: O autor, 2017.

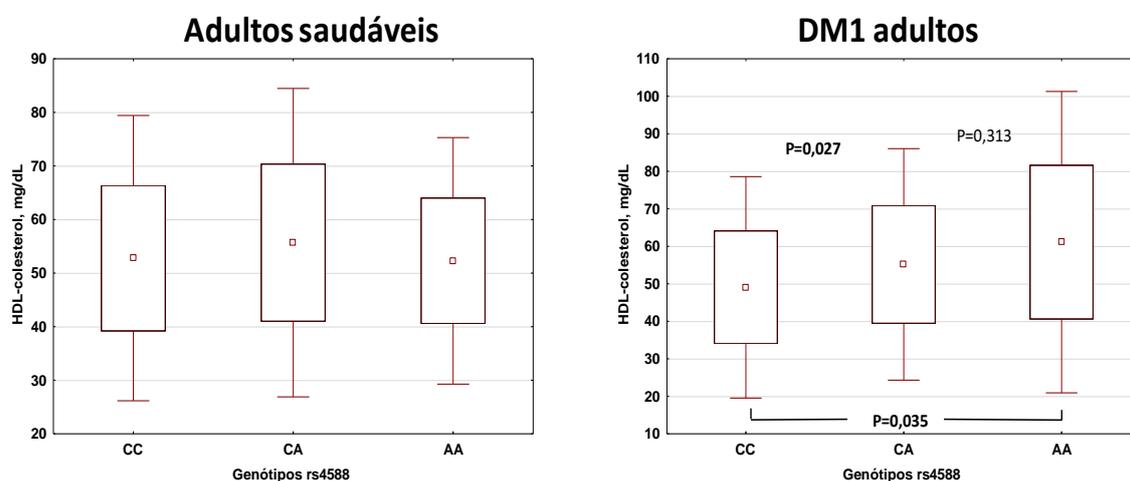
A frequência para o alelo (A) menor no grupo saudável (controles) foi similar ao encontrado para a população europeia (26,7%), italiana (26,1%) e

mexicana (26,0%). Frequência significativamente menor foi encontrada em africanos (3,6%) (HAPMAP, 2016a).

A frequência do alelo A no grupo DM1 em estudo foi equivalente a dos americanos (29,4%) e valores menores foram encontrados na população tailandesa (MANEECHAY *et al.*, 2015).

Na busca por associação entre os genótipos e as concentrações dos marcadores bioquímicos, foi constatada a associação entre este polimorfismo e a concentração sérica de HDL-colesterol (Figura 14).

FIGURA 14 – ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO rs4588 DO GENE *DBP* COM A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HDL-COLESTEROL.



Os valores são média, 1-desvio padrão (caixa) e 2-desvios padrão (barras horizontais).

As comparações (P) entre os genótipos com o teste de Mann-Whitney. Em negrito, probabilidade significativa.

ANOVA para controles saudáveis ( $P=0.461$ ) e para o grupo DM1 ( $P=0.025$ )

O grupo controle não apresentou diferença significativa entre os genótipos ( $P>0,05$ ).

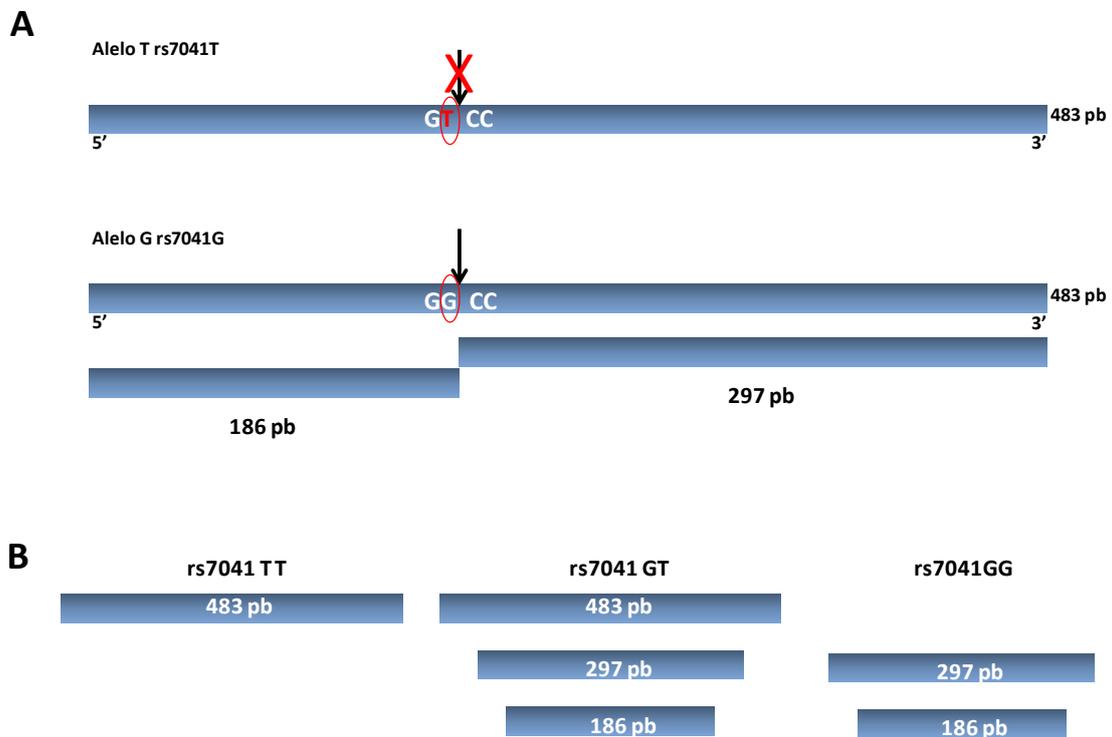
Na análise de associação dos genótipos com as concentrações dos marcadores bioquímicos, foi encontrado significância entre as concentrações de HDL-colesterol e a presença do alelo A (CA+AA) na população estudada. A presença o alelo A está associada, a um aumento nas concentrações de HDL-colesterol somente no grupo DM1. Igual associação não foi encontrada para o grupo de indivíduos saudáveis ( $P>0,05$ ). O alelo A foi associado a menores concentrações de 25D/1,25D em relação ao alelo C (JOLLIFFE *et al.*, 2016), o que resulta de afinidade alterada pela DBD na presença dos diferentes alelos do rs4588. A DBP com o genótipo CC tem maior afinidade pela 25D/1,25D do

que com o genótipo AA no rs4588 (ARNAUD; CONSTANS, 1993). Adicionalmente, Faridi e colaboradores (2017) mostraram que a deficiência de 25(OH)D foi associada a menores concentrações de colesterol total e HDL-C. Desta forma, a associação da presença do alelo C no rs4588 na DBP com maiores concentrações plasmáticas de 1,25(OH)<sub>2</sub>D poderia justificar sua associação com maiores concentrações de HDL-C. JAIMUNGAL *et al.* (2011) evidenciaram que nos hepatócitos e células epiteliais do intestino delgado, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D demonstrou inibir a expressão do gene da apo A-1 e a secreção de HDL. No entanto, nenhum dos estudos já publicados mostra um efeito prejudicial da vitamina D nos lipídios plasmáticos. Estudos observacionais sugerem que a 25(OH)D está positivamente correlacionada com os níveis de apo A-1 e possivelmente com HDLc. Certamente, novos estudos com tamanho amostral adequado devem ser realizados para confirmar este achado.

#### **5.2.4 Polimorfismo rs7041 do gene *DBP***

A genotipagem do polimorfismo rs7041 foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Read*) e os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Hae* III (conforme descrito no tópico 4.4 de Materiais e Métodos) gerando os perfis de restrição detalhados na Figura 15.

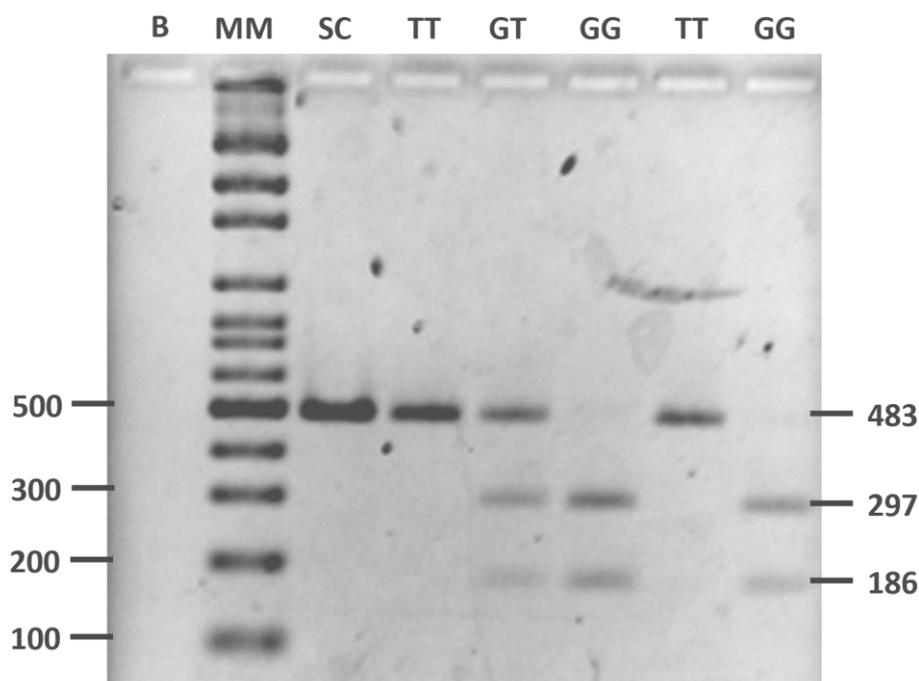
FIGURA 15 – MAPA DE RESTRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A *Hae*III PARA O POLIMORFISMO rs7041.



A: MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR (483 pb) DO GENE *DBP*. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Hae* III. O “X” em vermelho simula a ausência do sítio de restrição no alelo selvagem rs7041T. Na presença do alelo T, não há o reconhecimento da enzima pelo sítio de restrição para que ocorra a clivagem, havendo apenas fragmentos com 483 pares de base (pb); na presença do alelo G há reconhecimento da enzima pelo sítio de restrição sendo possível visualizar fragmentos de 186 e 297 pb. B: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs7041 T>G do gene *DBP*. O indivíduo homocigoto TT apresenta um fragmento de 483 pb correspondente ao fragmento gerado pela PCR; o heterocigoto GT apresenta 3 fragmentos (483 pb, 297 pb, e 186 pb) e o homocigoto GG, 2 fragmentos (297 pb e 186 pb).  
Fonte: O autor (2017).

Após a etapa de restrição, os géis de agarose a 2% foram analisados para os fragmentos acima descritos. Na Figura 16 é possível observar uma amostra que não teve contato com enzima de restrição (sem corte) utilizada como controle, contendo um fragmento de 483 pb e as amostras incubadas com a enzima de restrição: um homocigoto TT apresentando apenas o fragmento de 483 pb; o heterocigoto do tipo GT com os fragmentos de 483 pb, 297 pb e 186 pb; e homocigotos GG com os fragmentos de 297 pb e 186 pb.

FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs7041 DO GENE *DBP*.



Eletroforese em agarose 2% (TBE 1X) dos fragmentos de restrição com a enzima *Hae* III. Genótipos TT (homozigoto), GT (heterozigoto), GG (homozigoto raro). B: branco da amostra. MM: marcador de massa molecular de 100 pares de base (pb). SC: amostra sem corte. Ao lado direito do gel a massa molecular esperada para os fragmentos de restrição.

FONTE: O autor, 2017.

As frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo rs7041 do gene *DBP*, e as comparações entre os grupos são apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs7041 DO GENE *DBP* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n=145)	DM1 (n=136)	P
<b>(rs7041)</b>				0,063
<b>T&gt;G</b>	G/G	49 (33,8%)	29 (21,3%)	
<b>DBP</b>	G/T	64 (44,1%)	68 (50,0%)	
	T/T	32 (22,1%)	39 (28,7%)	
<b>Frequência do Alelo</b>				<b>0,029</b>
	T	44,5 [39-50]	53,7 [48-60]	
<b>Dominante</b>	GG vs GT+TT	49/96	29/107	<b>0,029</b>
<b>Recessivo</b>	TT vs GT+GG	32/113	39/97	0,256

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ .

As frequências genotípicas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ) com  $P > 0,05$  para os polimorfismos nos dois grupos.

FONTE: O autor, 2017.

As frequências alélicas foram diferentes significativamente entre os grupos ( $P=0,029$ ), sugerindo que a presença do alelo T está associada ao risco maior de desenvolvimento de DM1 na população estudada. O modelo dominante mostrou significância ( $P=0,029$ ), sugerindo que a presença do alelo G poderia estar associada à proteção em relação ao DM1. Em contraste com estes achados, Ongagna e colaboradores (2005) constataram os portadores do alelo G apresentam maior risco para o desenvolvimento de DM1 em população do leste da França.

A Tabela 10 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas deste estudo para o polimorfismo rs7041 com outras populações.

TABELA 10 – COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7041 DO GENE *DBP* COM A LITERATURA.

DBP rs7041			GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	GG	GT	TT	T
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	145	33,8	44,1	22,1	44,5 [39-50]
	Pacientes DM1	136	21,3	50,0	28,7	53,7 [48-60]
Italianos (AGNELLO <i>et al.</i> , 2016)	Controles	92	40,0	38,0	22,0	59,0
	Pacientes MS	100	36,0	41,0	23,0	56,0
Italianos (AGLIARDI <i>et al.</i> , 2017)	Controles	831	34,3	49,6	16,1	59,1
	Pacientes MS	701	32,2	49,9	17,8	57,2
Americanos (BLANTON <i>et al.</i> , 2011)	Controles	1828	31,7	48,4	20	55,9
	Pacientes DM1	1454	30,0	49,7	19,9	55,2
HAPMAP-MEX	Mexicanos	100	24	48	28	48,0
HAPMAP-CEU	Europeus	224	32,1	49,1	18,7	43,3
Tailandeses (MANEECHAY <i>et al.</i> , 2015)	Controles	282	12,4	40,1	47,5	32,4
	Pacientes CC	282	15,6	43,2	41,1	37,2
Taiwaneses (LEE, S. W. <i>et al.</i> , 2016)	Controles	170	12,3	40,6	47,0	32,6
	Pacientes TB	198	6,1	42,4	51,5	27,3

DBP rs7041			GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	GG	GT	TT	T
HAPMAP-HCB	Han-Chineses	82	2,4	53,6	43,9	<b>29,3</b>
HAPMAP-JPT	Japoneses	172	8,1	32,5	59,3	<b>24,4</b>
HAPMAP-YRI	Africanos	226	0,9	15,9	83,1	<b>8,8</b>

Em negrito, destacados os dados das amostras em estudo. DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; EM: esclerose múltipla; TB: tuberculose; CC: câncer colorretal.

Comparações em negrito destacam a frequência do alelo menor diferente do Intervalo de confiança de 95% para o grupo controle [95%IC 39-50%]

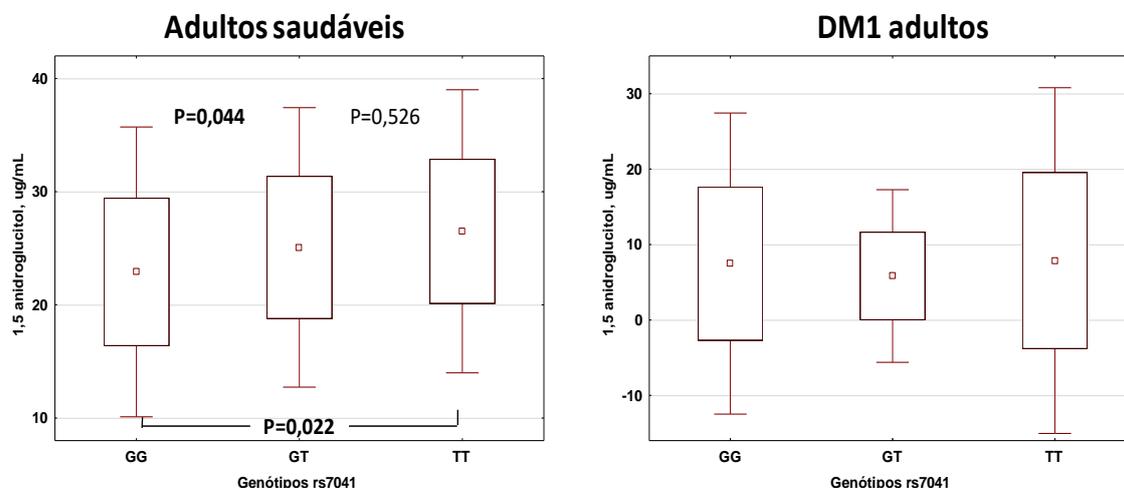
HAPMAP-TSI: Toscanos, Itália; HAPMAP-MEX: Mexicanos com ascendência em Los Angeles, Califórnia; HAPMAP-HCB: Chineses Han, Beijing, China; HAPMAP-JPT: Japoneses, Tóquio, Japão; HAPMAP-YRI: Yoruba, Ibadan, Nigéria. HAPMAP capturado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.

FONTE: O autor, 2017.

A frequência do alelo T, menor, encontrada neste estudo para adultos saudáveis (44,5%) é inferior ao relatado para Caucasoídeos Italianos (52,2%) e Mexicanos (48,0%) e similares a descendentes Europeus de Utah (43,3%), porém significativamente maior que a encontrada na população Africana (8,8%) (HAPMAP, 2016b). Ao comparar o grupo Euro-Brasileiro DM1, com população de Americanos também portadores de DM1, os valores encontrados são similares, sendo 53,7% para a população brasileira e 55,2% para os americanos (BLANTON *et al.*, 2011).

A busca por associação dos genótipos do rs7041 com as concentrações dos biomarcadores evidenciou associação entre esse polimorfismo e o 1,5 anidroglicitol, um marcador de controle glicêmico de curto prazo (Figura 17).

FIGURA 17 – ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO rs7041 DO GENE *DBP* COM A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 1,5 ANIDROGLUCITOL.



Os valores são média, 1-desvio padrão (caixa) e 2-desvios padrão (barras horizontais). As comparações (P) entre os genótipos com o teste de Mann-Whitney. Em negrito probabilidade significativa. ANOVA para controles saudáveis (P=0,040) e para o grupo DM1 (P=0,689). O grupo DM1 adulto não apresentou diferença significativa entre os genótipos (P>0,05).

O 1,5AG é um marcador de curto período para a glicemia pós-prandial (DUNGAN, 2008) e reflete rápidas e sensíveis mudanças na glicemia (MCGILL *et al.*, 2004). O *locus* da proteína de ligação da vitamina D tem sido associado com o metabolismo da glicose (IYENGAR *et al.*, 1989; BAIER *et al.*, 1998) e secreção de insulina (SZATHMARY, 1987; HIRAI *et al.*, 2000). A vitamina D exerce seus efeitos regulando as concentrações extracelulares de cálcio nas células beta, e assim promovendo secreção de insulina (ALVAREZ; ASHRAF, 2010). Temos, como hipótese, que variantes na DBP podem ligar ao calcitriol com afinidades diferentes, desta forma afetando sua concentração nas células beta pancreáticas. Contudo, o rs7041 não foi associado às concentrações plasmáticas de 1,25(OH)<sub>2</sub>D (ENGELMAN *et al.*, 2008). Baier *et al.* (1998) sugerem que talvez a associação entre as variantes na DBP e a secreção de insulina poderiam ser mediadas por outros de seus ligantes, como por exemplo, os ácidos graxos, e que em concentrações elevadas poderiam induzir anormalidades nas células das ilhotas (UNGER, 1995). Outra possibilidade seria de que a associação entre redução na tolerância à glicose e a DBP fosse devida a variações ligadas aos outros genes presentes no cromossomo 4q12, que poderiam estar em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo deste gene ou de outros próximos, os quais seriam os responsáveis pelo efeito observado. Novos estudos com maior tamanho amostral são necessários para

confirmar esta associação, que pode ser um artefato, devido ao tamanho amostral do presente estudo.

## 6. CONCLUSÕES

- O polimorfismo rs731236 do gene *VDR* foi associado ao DM1 quando analisado no modelo recessivo, sugerindo que a presença do alelo C confere risco à doença (Odds ratio: 2,48; 95%IC: 1,16-5,31);
- O polimorfismo rs7041 do gene *DBP* foi associado ao DM1 quando analisado no modelo dominante sugerindo que a presença do alelo G confere proteção à doença;
- Os polimorfismos rs2228570 e rs732236 do gene *VDR*; e rs4588 e rs7041 do gene *DBP* não foram associados ao DM1 no modelo codominante da amostra em estudo;
- As frequências para os alelos raros dos polimorfismos em estudo foram, no geral, similares aos descritos para outras populações Europeias ou Caucasoídes e menores quando comparados a Orientais.
- A presença do alelo T do polimorfismo rs2228570 foi associada a uma redução significativa ( $P=0,013$ ) das concentrações plasmáticas de colesterol total, em cerca de 12,7%, em indivíduos saudáveis;
- A presença do alelo C do polimorfismo rs4588 foi associada ao aumento da concentração de HDL-colesterol ( $P=0,027$ ) em indivíduos adultos portadores de DM1.
- A presença do alelo G do polimorfismo rs7041 foi associada à diminuição das concentrações plasmáticas de 1,5 anidroglicitol ( $P=0,044$ ) somente no grupo de indivíduos saudáveis.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABD-ALLAH, S. H. *et al.* Vitamin D status and vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Egyptian children. **Gene**. v. 536, n.2, p. 430-4. 2014.
- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. . **Diabetes Care**. v. n.1, p. 8-16. 2015.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes 2016. **The Journal of clinical and applied research and education**. v. 39, p. 2016.
- ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes. **American Diabetes Association**. v. p. 11. 2017a.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetesd2017. **Diabetes Care**. v. 40, n.1, p. 142. 2017b.
- AGARWAL, A. *et al.* Prognostic Factors in Patients Hospitalized with Diabetic Ketoacidosis. **Endocrinol Metab (Seoul)**. v. 31, n.3, p. 424-432. 2016.
- AGLIARDI, C. *et al.* Vitamin D-binding protein gene polymorphisms are not associated with MS risk in an Italian cohort. **J Neuroimmunol**. v. 305, p. 92-95. 2017.
- AGNELLO, L. *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. **Neurol Sci**. v. 37, n.2, p. 261-7. 2016.
- ALIZADEH, B. Z.; KOELEMAN, B. P. Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. **Clin Chim Acta**. v. 387, n.1-2, p. 9-17. 2008.
- ALTIERI, B. *et al.* Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. **Rev Endocr Metab Disord**. v. 18, n.3, p. 335-346. 2017.
- ALVAREZ, J. A.; ASHRAF, A. Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. **Int J Endocrinol**. v. 2010, p. 351385. 2010.
- ARAUZ-PACHECO, C.; PARROTT, M. A.; RASKIN, P. The treatment of hypertension in adult patients with diabetes. **Diabetes Care**. v. 25, n.1, p. 134-47. 2002.
- ARNAUD, J.; CONSTANS, J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). **Hum Genet**. v. 92, n.2, p. 183-8. 1993.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**. v. 383, n.9911, p. 69-82. 2014.

AUDI, L. *et al.* VDR gene polymorphism at exon 2 start codon (FokI) may have influenced Type 1 diabetes mellitus susceptibility in two Spanish populations. **Diabet Med.** v. 21, n.4, p. 393-4. 2004.

BAAN, C. *et al.* Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts. **Am J Transplant.** v. 4, n.5, p. 811-8. 2004.

BAIER, L. J. *et al.* Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) are associated with oral glucose tolerance in nondiabetic Pima Indians. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 83, n.8, p. 2993-6. 1998.

BAN, Y. *et al.* Vitamin D receptor initiation codon polymorphism influences genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Japanese population. **BMC Med Genet.** v. 2, p. 7. 2001.

BARBEAU, W. E. What is the key environmental trigger in type 1 diabetes--is it viruses, or wheat gluten, or both? **Autoimmun Rev.** v. 12, n.2, p. 295-9. 2012.

BARRETT, J. C. *et al.* Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. **Nat Genet.** v. 41, n.6, p. 703-7. 2009.

BERRY, D.; HYPPONEN, E. Determinants of vitamin D status: focus on genetic variations. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** v. 20, n.4, p. 331-6. 2011.

BJORNSTAD, P.; CHERNEY, D.; MAAHS, D. M. Early diabetic nephropathy in type 1 diabetes: new insights. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.** v. 21, n.4, p. 279-86. 2014.

BLANTON, D. *et al.* Reduced serum vitamin D-binding protein levels are associated with type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 60, n.10, p. 2566-70. 2011.

BORCHERS, A. T.; UIBO, R.; GERSHWIN, M. E. The geoepidemiology of type 1 diabetes. **Autoimmun Rev.** v. 9, n.5, p. A355-65. 2010.

BOUCHER, B. J. Association between vitamin D receptor (VDR) polymorphism and type 2 diabetes. **Metabolism-Clinical and Experimental.** v. 51, n.10, p. 1375; author reply 1375. 2002.

BOUILLON, R. *et al.* Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr Rev.** v. 29, n.6, p. 726-76. 2008.

BOURLON, P. M.; FAURE-DUSSERT, A.; BILLAUDEL, B. Modulatory role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on pancreatic islet insulin release via the cyclic AMP pathway in the rat. **Br J Pharmacol.** v. 121, n.4, p. 751-8. 1997.

BRAUN, A.; BICHLMAIER, R.; CLEVE, H. Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. **Hum Genet.** v. 89, n.4, p. 401-6. 1992.

CAKIR, O. O. *et al.* Association of the BsmI, Apal, TaqI, Tru9I and FokI Polymorphisms of the Vitamin D Receptor Gene with Nephrolithiasis in the Turkish Population. **Urol J.** v. 13, n.1, p. 2509-18. 2016.

CAPOLUONGO, E. *et al.* Slight association between type 1 diabetes and "ff" VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications. **Clin Biochem.** v. 39, n.9, p. 888-92. 2006.

CHAKHTOURA, M.; AZAR, S. T. The role of vitamin d deficiency in the incidence, progression, and complications of type 1 diabetes mellitus. **Int J Endocrinol.** v. 2013, p. 148673. 2013.

CHANG, T. J. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. **Clin Endocrinol (Oxf).** v. 52, n.5, p. 575-80. 2000.

CHEON, C. K. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus in a Korean population. **Pediatr Int.** v. 57, n.5, p. 870-4. 2015.

CHERNAUSEK, S. D. *et al.* Relationship Between Parental Diabetes and Presentation of Metabolic and Glycemic Function in Youth With Type 2 Diabetes: Baseline Findings From the TODAY Trial. **Diabetes Care.** v. 39, n.1, p. 110-7. 2016.

CHRISTAKOS, S. *et al.* Vitamin D: metabolism. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 39, n.2, p. 243-53, table of contents. 2010.

CHRISTIANSEN, M. *et al.* Protein chemical characterization of Gc globulin (vitamin D-binding protein) isoforms; Gc-1f, Gc-1s and Gc-2. **Biochim Biophys Acta.** v. 1774, n.4, p. 481-92. 2007.

COLAGAR, A. H.; FIROUZJAH, H. M.; HALALKHOR, S. Vitamin D Receptor Poly(A) Microsatellite Polymorphism and 25-Hydroxyvitamin D Serum Levels: Association with Susceptibility to Breast Cancer. **J Breast Cancer.** v. 18, n.2, p. 119-25. 2015.

CRAIG, M. E. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes.** v. 15 Suppl 20, p. 4-17. 2014.

CSASZAR, A.; ABEL, T. Receptor polymorphisms and diseases. **Eur J Pharmacol.** v. 414, n.1, p. 9-22. 2001.

CUCCA, F. *et al.* A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. **Hum Mol Genet.** v. 10, n.19, p. 2025-37. 2001.

CYGANEK, K. *et al.* Clinical risk factors and the role of VDR gene polymorphisms in diabetic retinopathy in Polish type 2 diabetes patients. **Acta Diabetol.** v. 43, n.4, p. 114-9. 2006.

DANKERS, W. *et al.* Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. **Front Immunol.** v. 7, p. 697. 2016.

DELANEY, M. F.; ZISMAN, A.; KETTYLE, W. M. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar nonketotic syndrome. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 29, n.4, p. 683-705, V. 2000.

DEMAY, M. B. *et al.* Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 89, n.17, p. 8097-101. 1992.

DILMEC, F. *et al.* Detection of VDR gene Apal and Taql polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. **J Diabetes Complications.** v. 24, n.3, p. 186-91. 2010.

DORCHY, H.; ROGGEMANS, M. P.; WILLEMS, D. Glycated hemoglobin and related factors in diabetic children and adolescents under 18 years of age: a Belgian experience. **Diabetes Care.** v. 20, n.1, p. 2-6. 1997.

DU, X. *et al.* The Influence of Family History Risk Levels of Diabetes on Disease Prevalence in a High-Risk Diabetic Chinese Population. **Diabetes Technol Ther.** v. 18, n.8, p. 494-8. 2016.

DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Rev Mol Diagn.** v. 8, n.1, p. 9-19. 2008.

EBERS, G. C. Environmental factors and multiple sclerosis. **Lancet Neurol.** v. 7, n.3, p. 268-77. 2008.

Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. **Kidney Int.** v. 47, n.6, p. 1703-20. 1995.

ELEDRISI, M. S. *et al.* Overview of the diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. **Am J Med Sci.** v. 331, n.5, p. 243-51. 2006.

ENGELMAN, C. D. *et al.* Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 93, n.9, p. 3381-8. 2008.

ERLICH, H. *et al.* HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes.** v. 57, n.4, p. 1084-92. 2008.

ESPARZA MARTIN, N.; GARCIA NIETO, V. Hypouricemia and tubular transport of uric acid. **Nefrologia**. v. 31, n.1, p. 44-50. 2011.

EYLES, D. W. *et al.* Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. **J Chem Neuroanat**. v. 29, n.1, p. 21-30. 2005.

FARIDI, K. F. *et al.* Serum vitamin D and change in lipid levels over 5 y: The Atherosclerosis Risk in Communities study. **Nutrition**. v. 38, p. 85-93. 2017.

FASSBENDER, W. J. *et al.* VDR gene polymorphisms are overrepresented in german patients with type 1 diabetes compared to healthy controls without effect on biochemical parameters of bone metabolism. **Horm Metab Res**. v. 34, n.6, p. 330-7. 2002.

FLORYS, B. *et al.* [Prevalence of chronic diabetes complications depending on the method of insulin therapy in children and adolescents with type 1 diabetes]. **Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw**. v. 10, n.1, p. 31-9. 2004.

FONG, D. S. *et al.* Diabetic retinopathy. **Diabetes Care**. v. 26, n.1, p. 226-9. 2003.

FORLENZA, G. P.; REWERS, M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**. v. 18, n.4, p. 248-51. 2011.

FOROUHI, N. G.; WAREHAM, N. J. Epidemiology of diabetes. **Medicine (Abingdon)**. v. 42, n.12, p. 698-702. 2014.

FREDERIKSEN, B. *et al.* 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**. v. 133, p. 51-7. 2013.

FREEDMAN, B. I. A critical evaluation of glycated protein parameters in advanced nephropathy: a matter of life or death: time to dispense with the hemoglobin A1C in end-stage kidney disease. **Diabetes Care**. v. 35, n.7, p. 1621-4. 2012.

FU, L. *et al.* Characterization of additional vitamin D binding protein variants. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v. 159, p. 54-9. 2016.

FU, L. *et al.* Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. **Clin Biochem**. v. 42, n.10-11, p. 1174-7. 2009.

GARCIA-QUIROZ, J. *et al.* Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy. **PLoS One**. v. 7, n.9, p. e45063. 2012.

GARCIA, D. *et al.* VDR polymorphisms influence the immune response in type 1 diabetic children from Santiago, Chile. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 77, n.1, p. 134-40. 2007.

GERICH, J. E. *et al.* Effects of physiologic levels of glucagon and growth hormone on human carbohydrate and lipid metabolism. Studies involving administration of exogenous hormone during suppression of endogenous hormone secretion with somatostatin. **J Clin Invest.** v. 57, n.4, p. 875-84. 1976.

GHELANI, A. M. *et al.* Association analysis of TNFR2, VDR, A2M, GSTT1, GSTM1, and ACE genes with rheumatoid arthritis in South Asians and Caucasians of East Midlands in the United Kingdom. **Rheumatol Int.** v. 31, n.10, p. 1355-61. 2011.

GOGAS YAVUZ, D. *et al.* Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI, TaqI polymorphisms and bone mineral density in a group of Turkish type 1 diabetic patients. **Acta Diabetol.** v. 48, n.4, p. 329-336. 2011.

GOMME, P. T.; BERTOLINI, J. Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. **Trends Biotechnol.** v. 22, n.7, p. 340-5. 2004.

GOZDZIK, A. *et al.* Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 127, n.3-5, p. 405-12. 2011.

GRANT, D. J. *et al.* Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and risk of ovarian cancer in Caucasian and African American women. **Gynecol Oncol.** v. 129, n.1, p. 173-8. 2013.

GUJA, C. *et al.* The study of CTLA-4 and vitamin D receptor polymorphisms in the Romanian type 1 diabetes population. **J Cell Mol Med.** v. 6, n.1, p. 75-81. 2002.

GULDEN, E.; WONG, F. S.; WEN, L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. **Clin Immunol.** v. 159, n.2, p. 143-53. 2015.

GUPTA, A. K.; SEXTON, R. C.; RUDNEY, H. Effect of vitamin D3 derivatives on cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in cultured cells. **J Lipid Res.** v. 30, n.3, p. 379-86. 1989.

GYORFFY, B. *et al.* Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol.** v. 147, n.6, p. 803-8. 2002.

HAPMAP. **International HapMap Project.** Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=731236](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=731236)>. Acesso em: 03/10/2016.

HAPMAP. **International HapMap Project.** Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2228570#map](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2228570#map)>. Acesso em: 29/09/2016.

HARJUTSALO, V.; SJOBERG, L.; TUOMILEHTO, J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. **Lancet.** v. 371, n.9626, p. 1777-82. 2008.

HAUSSLER, M. R. *et al.* The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the "Fountain of Youth" to mediate healthful aging. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 121, n.1-2, p. 88-97. 2010.

HAUSSLER, M. R. *et al.* The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. **J Bone Miner Res.** v. 13, n.3, p. 325-49. 1998.

HAUSSLER, M. R. *et al.* Molecular mechanisms of vitamin D action. **Calcif Tissue Int.** v. 92, n.2, p. 77-98. 2013.

HIRAI, M. *et al.* Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 85, n.5, p. 1951-3. 2000.

HITMAN, G. A. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. **Diabetes.** v. 47, n.4, p. 688-90. 1998.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med.** v. 357, n.3, p. 266-81. 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutr Rev.** v. 66, n.10 Suppl 2, p. S182-94. 2008.

HOWSON, J. M. *et al.* Genetic analysis of adult-onset autoimmune diabetes. **Diabetes.** v. 60, n.10, p. 2645-53. 2011.

HYPONEN, E. *et al.* Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. **Lancet.** v. 358, n.9292, p. 1500-3. 2001.

IDF. Diabetes Atlas. v. p. 2015.

IDZIOR-WALUS, B. *et al.* Factors associated with plasma lipids and lipoproteins in type 1 diabetes mellitus: the EURODIAB IDDM Complications Study. **Diabet Med.** v. 18, n.10, p. 786-96. 2001.

IKEGAMI, H. *et al.* Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucasian populations. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 77 Suppl 1, p. S116-21. 2007.

ILONEN, J. *et al.* Environmental factors and primary prevention in type 1 diabetes. **Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.** v. 15, n.4, p. 227-32. 2009.

ISLAM, M. Z. *et al.* Effect of vitamin D, calcium and multiple micronutrients supplementation on lipid profile in pre-menopausal Bangladeshi garment factory workers with hypovitaminosis D. **J Health Popul Nutr.** v. 32, n.4, p. 687-95. 2014.

ISRANI, N. *et al.* Interaction of vitamin D receptor with HLA DRB1 0301 in type 1 diabetes patients from North India. **PLoS One.** v. 4, n.12, p. e8023. 2009.

IYENGAR, S. *et al.* On the role of vitamin D binding globulin in glucose homeostasis: results from the San Luis Valley Diabetes Study. **Genet Epidemiol.** v. 6, n.6, p. 691-8. 1989.

JAIMUNGAL, S. *et al.* The emerging evidence for vitamin D-mediated regulation of apolipoprotein A-I synthesis. **Nutr Res.** v. 31, n.11, p. 805-12. 2011.

JAIN, A.; SARRAF, D.; FONG, D. Preventing diabetic retinopathy through control of systemic factors. **Curr Opin Ophthalmol.** v. 14, n.6, p. 389-94. 2003.

JAMES, D. E.; PIPER, R. C. Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4. **J Cell Biol.** v. 126, n.5, p. 1123-6. 1994.

JAMES, D. E.; PIPER, R. C.; SLOT, J. W. Insulin stimulation of GLUT-4 translocation: a model for regulated recycling. **Trends Cell Biol.** v. 4, n.4, p. 120-6. 1994.

JOLLIFFE, D. A. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentrations of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: Review of genetic association studies. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 164, p. 18-29. 2016.

JOSHI, S. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. **Mol Cell Biol.** v. 31, n.17, p. 3653-69. 2011.

JURUTKA, P. W. *et al.* Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. **Rev Endocr Metab Disord.** v. 2, n.2, p. 203-16. 2001.

K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Am J Kidney Dis.** v. 39, n.2 Suppl 1, p. S1-266. 2002.

KAMINSKI, B. M. *et al.* Body mass index at the time of diagnosis of autoimmune type 1 diabetes in children. **J Pediatr.** v. 162, n.4, p. 736-740 e1. 2013.

KARVONEN, M. *et al.* Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. **Diabetes Care.** v. 23, n.10, p. 1516-26. 2000.

KAWABATA, Y. *et al.* Asian-specific HLA haplotypes reveal heterogeneity of the contribution of HLA-DR and -DQ haplotypes to susceptibility to type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 51, n.2, p. 545-51. 2002.

KAWASAKI, E.; ABIRU, N.; EGUCHI, K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of beta cell damage. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 66 Suppl 1, p. S27-32. 2004.

KITABCHI, A. E. *et al.* Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes. **Diabetes Care**. v. 24, n.1, p. 131-53. 2001.

KITABCHI, A. E. *et al.* Hyperglycemic crises in diabetes. **Diabetes Care**. v. 27 Suppl 1, p. S94-102. 2004.

KLUPA, T. *et al.* Amino acid variants of the vitamin D-binding protein and risk of diabetes in white Americans of European origin. **Eur J Endocrinol**. v. 141, n.5, p. 490-3. 1999.

KOCABAS, A. *et al.* Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to disease and bone mineral density in Turkish patients with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr Endocrinol Metab**. v. 23, n.12, p. 1289-97. 2010.

KOELEMAN, B. P. *et al.* Genotype effects and epistasis in type 1 diabetes and HLA-DQ trans dimer associations with disease. **Genes Immun**. v. 5, n.5, p. 381-8. 2004.

KOGA, M. 1,5-Anhydroglucitol and glycated albumin in glycemia. **Adv Clin Chem**. v. 64, p. 269-301. 2014.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**. v. 19, n.19, p. 5444. 1991.

LEE, S. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. **Endocrinology**. v. 134, n.4, p. 1602-10. 1994.

LEE, S. I. *et al.* Cardiovascular disease and type 1 diabetes: prevalence, prediction and management in an ageing population. **Ther Adv Chronic Dis**. v. 6, n.6, p. 347-74. 2015.

LEE, S. W. *et al.* VDR and VDBP genes polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. **J Microbiol Immunol Infect**. v. 49, n.5, p. 783-787. 2016.

LEMIRE, J. M. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. **J Cell Biochem**. v. 49, n.1, p. 26-31. 1992.

LEMOS, M. C. *et al.* Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. **Hum Immunol.** v. 69, n.2, p. 134-8. 2008.

LEVEY, A. S. *et al.* Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. **Kidney Int.** v. 72, n.3, p. 247-59. 2007.

LI, F. *et al.* Vitamin D binding protein variants associate with asthma susceptibility in the Chinese Han population. **Bmc Medical Genetics.** v. 12, p. 103. 2011.

MAAHS, D. M. *et al.* Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 39, n.3, p. 481-97. 2010.

MAALEJ, A. *et al.* Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population. **Genes and Immunity.** v. 6, n.8, p. 707-11. 2005.

MAKI, K. C. *et al.* Effects of vitamin D supplementation on 25-hydroxyvitamin D, high-density lipoprotein cholesterol, and other cardiovascular disease risk markers in subjects with elevated waist circumference. **Int J Food Sci Nutr.** v. 62, n.4, p. 318-27. 2011.

MALECKI, M. T. *et al.* Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 57, n.2, p. 99-104. 2002.

MANEECHAY, W. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the Gc gene for vitamin D binding protein in common cancers in Thailand. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 16, n.8, p. 3339-44. 2015.

MANZON, L. *et al.* Vitamin D receptor polymorphism FokI is associated with spontaneous idiopathic preterm birth in an Israeli population. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 177, p. 84-8. 2014.

MCDERMOTT, M. F. *et al.* Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. **Diabetologia.** v. 40, n.8, p. 971-5. 1997.

MCGILL, J. B. *et al.* Circulating 1,5-anhydroglucitol levels in adult patients with diabetes reflect longitudinal changes of glycemia: a U.S. trial of the GlycoMark assay. **Diabetes Care.** v. 27, n.8, p. 1859-65. 2004.

MEHRA, N. K.; KAUR, G. Histocompatibility Antigen Complex of Man. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES.** v. p. 2001.

MIJOVIC, C. H. *et al.* HLA-DQA1 and -DQB1 alleles associated with genetic susceptibility to IDDM in a black population. **Diabetes.** v. 40, n.6, p. 748-53. 1991.

MITRI, J.; PITTAS, A. G. Vitamin D and diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 43, n.1, p. 205-32. 2014.

MOHAMMADNEJAD, Z. *et al.* Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus in Iranian population. **Mol Biol Rep.** v. 39, n.2, p. 831-7. 2012a.

MOHAMMADNEJAD, Z. *et al.* Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus in Iranian population. **Molecular Biology Reports.** v. 39, n.2, p. 831-7. 2012b.

MORA, J. R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n.9, p. 685-98. 2008.

MORAHAN, G. Insights into type 1 diabetes provided by genetic analyses. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.** v. 19, n.4, p. 263-70. 2012.

MORAN-AUTH, Y.; PENNA-MARTINEZ, M.; BADENHOOP, K. VDR FokI polymorphism is associated with a reduced T-helper cell population under vitamin D stimulation in type 1 diabetes patients. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 148, p. 184-6. 2015.

MORRISH, N. J. *et al.* Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. **Diabetologia.** v. 44 Suppl 2, p. S14-21. 2001.

MORRISON, N. A. *et al.* Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 89, n.15, p. 6665-9. 1992.

MORTENSEN, H. B.; HOUGAARD, P. Comparison of metabolic control in a cross-sectional study of 2,873 children and adolescents with IDDM from 18 countries. The Hvidovre Study Group on Childhood Diabetes. **Diabetes Care.** v. 20, n.5, p. 714-20. 1997.

MORY, D. B. *et al.* 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. **Hum Immunol.** v. 70, n.6, p. 447-51. 2009.

MOTOHASHI, Y. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 88, n.7, p. 3137-40. 2003.

NAITO, M. *et al.* Association between vitamin D receptor gene haplotypes and chronic periodontitis among Japanese men. **Int J Med Sci.** v. 4, n.4, p. 216-22. 2007.

NAMIPASHAKI, A.; RAZAGHI-MOGHADAM, Z.; ANSARI-POUR, N. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. **Cell J.** v. 17, n.2, p. 187-92. 2015.

NEJENTSEV, S. *et al.* Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. **Hum Mol Genet.** v. 13, n.15, p. 1633-9. 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* v. 6. ed, p. 559. 2014.

NOBLE, J. A.; VALDES, A. M. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. **Curr Diab Rep.** v. 11, n.6, p. 533-42. 2011.

NOBLE, J. A. *et al.* The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. **Am J Hum Genet.** v. 59, n.5, p. 1134-48. 1996.

NOBLE, J. A. *et al.* HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. **Diabetes.** v. 59, n.11, p. 2972-9. 2010.

NYENWE, E. A.; KITABCHI, A. E. The evolution of diabetic ketoacidosis: An update of its etiology, pathogenesis and management. **Metabolism-Clinical and Experimental.** v. 65, n.4, p. 507-21. 2016.

OGUNKOLADE, B. W. *et al.* Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. **Diabetes.** v. 51, n.7, p. 2294-300. 2002.

OGURTSOVA, K. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 128, p. 40-50. 2017.

OH, J. Y.; BARRETT-CONNOR, E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. **Metabolism-Clinical and Experimental.** v. 51, n.3, p. 356-9. 2002.

ONGAGNA, J. C. *et al.* The HLA-DQB alleles and amino acid variants of the vitamin D-binding protein in diabetic patients in Alsace. **Clin Biochem.** v. 34, n.1, p. 59-63. 2001.

ONGAGNA, J. C.; PINGET, M.; BELCOURT, A. Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes. **Clin Biochem.** v. 38, n.5, p. 415-9. 2005.

ONKAMO, P. *et al.* Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia**. v. 42, n.12, p. 1395-403. 1999.

OTTERBEIN, L. R. *et al.* Crystal structures of the vitamin D-binding protein and its complex with actin: structural basis of the actin-scavenger system. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 99, n.12, p. 8003-8. 2002.

PANI, M. A. *et al.* Vitamin D binding protein alleles and susceptibility for type 1 diabetes in Germans. **Autoimmunity**. v. 31, n.1, p. 67-72. 1999.

PANI, M. A. *et al.* Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. **Diabetes**. v. 49, n.3, p. 504-7. 2000.

PANIERAKIS, C. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. **Clin Immunol**. v. 133, n.2, p. 276-81. 2009.

PARK, Y. S. *et al.* Combinations of HLA DR and DQ molecules determine the susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in Koreans. **Hum Immunol**. v. 59, n.12, p. 794-801. 1998.

PATTERSON, C. *et al.* Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 103, n.2, p. 161-75. 2014.

PATTERSON, C. C. *et al.* Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet**. v. 373, n.9680, p. 2027-33. 2009.

PENNA-MARTINEZ, M.; BADENHOOP, K. Inherited Variation in Vitamin D Genes and Type 1 Diabetes Predisposition. **Genes (Basel)**. v. 8, n.4, p. 2017.

PEREZ, A. *et al.* Prevalence and phenotypic distribution of dyslipidemia in type 1 diabetes mellitus: effect of glycemic control. **Arch Intern Med**. v. 160, n.18, p. 2756-62. 2000.

PETITTI, D. B. *et al.* Serum lipids and glucose control: the SEARCH for Diabetes in Youth study. **Arch Pediatr Adolesc Med**. v. 161, n.2, p. 159-65. 2007.

POCIOT, F. *et al.* Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes**. v. 59, n.7, p. 1561-71. 2010.

POLYCHRONAKOS, C.; LI, Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. **Nat Rev Genet**. v. 12, n.11, p. 781-92. 2011.

POUDEL, A. *et al.* Beta-cell destruction and preservation in childhood and adult onset type 1 diabetes. **Endocrine**. v. 49, n.3, p. 693-702. 2015.

PUGLIATTI, M. *et al.* Environmental risk factors in multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand Suppl**. v. 188, p. 34-40. 2008.

QUAN, T. T. *et al.* [Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with idiopathic hypoparathyroidism phenotypes]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. v. 97, n.36, p. 2833-2838. 2017.

RAHMAN, M. M. *et al.* Association of vitamin D and vitamin D binding protein (DBP) gene polymorphism with susceptibility of type 2 diabetes mellitus in Bangladesh. **Gene**. v. 636, p. 42-47. 2017.

RAMESAN, R. M.; SHARMA, C. P. Challenges and advances in nanoparticle-based oral insulin delivery. **Expert Rev Med Devices**. v. 6, n.6, p. 665-76. 2009.

RASMUSSEN, B. S. *et al.* Substantial reduction in the number of amputations among patients with diabetes: a cohort study over 16 years. **Diabetologia**. v. 59, n.1, p. 121-9. 2016.

REDONDO, M. J. *et al.* Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. **N Engl J Med**. v. 359, n.26, p. 2849-50. 2008.

RENNERT, O. M.; FRANCIS, G. L. Update on the genetics and pathophysiology of type I diabetes mellitus. **Pediatr Ann**. v. 28, n.9, p. 570-5. 1999.

RISCH, N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. **Am J Hum Genet**. v. 40, n.1, p. 1-14. 1987.

ROCHEL, N. *et al.* The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. **Mol Cell**. v. 5, n.1, p. 173-9. 2000.

ROEP, B. O.; PEAKMAN, M. Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 2, n.4, p. a007781. 2012.

ROJAS-VILLARRAGA, A.; BOTELLO-CORZO, D.; ANAYA, J. M. HLA-Class II in Latin American patients with type 1 diabetes. **Autoimmun Rev**. v. 9, n.10, p. 666-73. 2010.

ROSE, K. *et al.* Influence of the vitamin D plasma level and vitamin D-related genetic polymorphisms on the immune status of patients with type 1 diabetes: a pilot study. **Clin Exp Immunol**. v. 171, n.2, p. 171-85. 2013.

ROSILIO, M. *et al.* Factors associated with glycemic control. A cross-sectional nationwide study in 2,579 French children with type 1 diabetes. The French Pediatric Diabetes Group. **Diabetes Care**. v. 21, n.7, p. 1146-53. 1998.

RUBIO CABEZAS, O.; ARGENTE OLIVER, J. [Diabetes mellitus in children and adolescents: chronic complications and associated diseases]. **An Pediatr (Barc)**. v. 66, n.3, p. 282-9. 2007.

SAFAR, H. A. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms among Emirati patients with type 2 diabetes mellitus. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v. p. 2017.

SAN-PEDRO, J. I. *et al.* Heterogeneity of vitamin D receptor gene association with celiac disease and type 1 diabetes mellitus. **Autoimmunity**. v. 38, n.6, p. 439-44. 2005.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes **Sociedade Brasileira de Diabetes**. v. p. 348. 2016a.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes **Sociedade Brasileira de Diabetes**. v. p. 348. 2016b.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes - Classificação Etiológica. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. v. p. 2016c.

SCHIPPER, R. F. *et al.* HLA class II associations with Type 1 diabetes mellitus: a multivariate approach. **Tissue Antigens**. v. 57, n.2, p. 144-50. 2001.

SHAHBAZI, S. *et al.* Bsm1 but not FokI polymorphism of VDR gene is contributed in breast cancer. **Med Oncol**. v. 30, n.1, p. 393. 2013.

SHE, J. X. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. **Immunol Today**. v. 17, n.7, p. 323-9. 1996.

SHICHIRI, M.; IWAMOTO, H.; SHIIGAI, T. Diabetic renal hypouricemia. **Arch Intern Med**. v. 147, n.2, p. 225-8. 1987.

SHIMADA, C. S. **Patologia Clínica e Onco-hematologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

SINGH, P. K. *et al.* Epigenetic distortion to VDR transcriptional regulation in prostate cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v. 136, p. 258-63. 2013.

SKRABIC, V. *et al.* Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 59, n.1, p. 31-5. 2003.

SNELL-BERGEON, J. K.; NADEAU, K. Cardiovascular disease risk in young people with type 1 diabetes. **J Cardiovasc Transl Res**. v. 5, n.4, p. 446-62. 2012.

SPEECKAERT, M. *et al.* Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. **Clin Chim Acta**. v. 372, n.1-2, p. 33-42. 2006.

SPERLING, M. A. Aspects of the etiology, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in childhood. **Pediatr Clin North Am.** v. 44, n.2, p. 269-84. 1997.

STANKOV, K.; BENC, D.; DRASKOVIC, D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. **Pediatrics.** v. 132, n.6, p. 1112-22. 2013.

SU, H. *et al.* Serum 1,5-anhydroglucitol levels slightly increase rather than decrease after a glucose load in subjects with different glucose tolerance status. **Acta Diabetol.** v. 54, n.5, p. 463-470. 2017.

SWARTLING, U. *et al.* Parental Estimation of Their Child's Increased Type 1 Diabetes Risk During the First 2 Years of Participation in an International Observational Study: Results From the TEDDY study. **J Empir Res Hum Res Ethics.** v. 11, n.2, p. 106-14. 2016.

SZATHMARY, E. J. The effect of Gc genotype on fasting insulin level in Dogrib Indians. **Hum Genet.** v. 75, n.4, p. 368-72. 1987.

TARDIEU, M.; MIKAELOFF, Y. [Multiple sclerosis in children: environmental risk factors]. **Bull Acad Natl Med.** v. 192, n.3, p. 507-9; discussion 509-10. 2008.

TESFAYE, S. *et al.* Vascular risk factors and diabetic neuropathy. **N Engl J Med.** v. 352, n.4, p. 341-50. 2005.

TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 28 Suppl 1, p. 8-14. 2012.

THOMAS, I. H.; PIETROPAOLO, M. Type 1 diabetes: a genetic Pandora's box? **Pediatr Diabetes.** v. 11, n.8, p. 511-2. 2010.

THOMSON, G. *et al.* Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. **Tissue Antigens.** v. 70, n.2, p. 110-27. 2007.

TIZAOUI, K. *et al.* Contribution of VDR polymorphisms to type 1 diabetes susceptibility: Systematic review of case-control studies and meta-analysis. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 143, p. 240-9. 2014.

TODD, J. A.; BELL, J. I.; MCDEVITT, H. O. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature.** v. 329, n.6140, p. 599-604. 1987.

UITTERLINDEN, A. G. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 89-90, n.1-5, p. 187-93. 2004.

UNGER, R. H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. **Diabetes**. v. 44, n.8, p. 863-70. 1995.

VALDIVIELSO, J. M.; FERNANDEZ, E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. **Clin Chim Acta**. v. 371, n.1-2, p. 1-12. 2006.

VEDRALOVA, M. *et al.* Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and parathyroid hormone gene in the development and progression of diabetes mellitus and its chronic complications, diabetic nephropathy and non-diabetic renal disease. **Kidney Blood Press Res**. v. 36, n.1, p. 1-9. 2012.

WADWA, R. P. *et al.* Awareness and treatment of dyslipidemia in young adults with type 1 diabetes. **Diabetes Care**. v. 28, n.5, p. 1051-6. 2005.

WANG, G. *et al.* Association of the vitamin D binding protein polymorphisms with the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. **BMJ Open**. v. 4, n.11, p. e005617. 2014.

WANG, Y. *et al.* Serum 1,5-anhydroglucitol level as a screening tool for diabetes mellitus in a community-based population at high risk of diabetes. **Acta Diabetol**. v. 54, n.5, p. 425-431. 2017.

WANG, Z. *et al.* Beyond Genetics: What Causes Type 1 Diabetes. **Clin Rev Allergy Immunol**. v. 52, n.2, p. 273-286. 2016.

WEINSTOCK, R. S. *et al.* Severe hypoglycemia and diabetic ketoacidosis in adults with type 1 diabetes: results from the T1D Exchange clinic registry. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 98, n.8, p. 3411-9. 2013.

WHITE, P.; COOKE, N. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. **Trends Endocrinol Metab**. v. 11, n.8, p. 320-7. 2000.

WHITFIELD, G. K. *et al.* Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. **Mol Cell Endocrinol**. v. 177, n.1-2, p. 145-59. 2001.

WHITING, D. R. *et al.* IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 94, n.3, p. 311-21. 2011.

WHO. World Health Statistics 2016: monitoring health for the sustainable development goals. v. p. 2016.

YU, F. *et al.* The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. **Asia Pac J Clin Nutr**. v. 25, n.3, p. 614-24. 2016.

ZHANG, J. *et al.* Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: an update by meta-analysis. **Mol Cell Endocrinol.** v. 355, n.1, p. 135-42. 2012.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. **J Immunol.** v. 154, n.8, p. 3821-35. 1995.

ZMUDA, J. M.; CAULEY, J. A.; FERRELL, R. E. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. **Epidemiol Rev.** v. 22, n.2, p. 203-17. 2000.

## ANEXO 1

### Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/SCS - UFPR

#### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes mellitus tipos 1, 2 e gestacional.

**Pesquisador:** Mauren Isfer Anghebem Oliveira

**Versão:** 1

**Instituição:** Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/SCS

**CAAE:** 01038112.0.0000.0102

#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 7186

**Data da Relatoria:** 28/03/2012

##### **Apresentação do Projeto:**

É um estudo caso-controle para análise de determinadas proteínas (sRAGE) com retirada de sangue em sujeitos portadores de diabetes mellitus tipo I (n=100), tipo 11 (n= 100) e gestacional (n=100), recrutados na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas (HC) da UFPRSEMPR, além de um grupo controle (n=300) composto de voluntários recrutados também no Hospital de Clínicas da UFPR. Para análises de dados da história clínica, biométricos dos sujeitos, os pesquisadores terão acesso ao prontuário dos sujeitos. As sRAGE encontram-se ligadas a complicações vasculares da diabetes, tendo portanto grande importância na compreensão da fisiopatologia da diabetes e de seu tratamento.

##### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo principal da pesquisa é identificar novos biomarcadores de risco/proteção associados à presença e concentração das isoformas solúveis do receptor para produtos finais de glicação avançada (sRAGE) em portadores de diabetes mellitus tipo I, " ou gestacional. Há o objetivo também de criar um biorepositório.

##### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto detalha de forma clara os riscos e os benefícios da pesquisa. Os riscos consistem nos riscos de um exame de sangue padrão (dor, incômodo, hematoma). Este exame já é feito de rotina nos pacientes portadores de Diabetes do HC, a amostra podendo ser utilizada para a pesquisa mediante o TCLE. Os benefícios são descritos claramente no projeto, assim como nos seus dois TCLE (para portadores de diabetes e controles).

##### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa faz parte de um projeto de Doutorado em Farmácia e Bioquímica. Ela apresenta metodologia sólida, conforme descrito na análise de mérito criteriosa. Ela faz parte da formação de um biorepositório, nos TCLE está explícito que as amostras poderão ser utilizadas em pesquisas posteriores.

##### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos necessários foram apresentados. Os TCLE precisam ser modificados para se adequar a legislação sobre biorepositórios.

##### **Recomendações:**

O item g dos TCLE tem de ser modificado. Como se trata de uma pesquisa que cria um biorepositório e não biobanco, todas as novas pesquisas necessitarão de TCLE. O TCLE deve ser modificado para se adequar às considerações descritas acima.

##### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Explicar que se trata da criação de um biorepositório nos objetivos. O Projeto de pesquisa pode ser aprovado, se este se adequar a legislação sobre biorepositórios, com modificações no TCLE. Citar os riscos no TCLE da armazenagem do material biológico.

No TCLE deve-se descrever caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, os sujeitos tem o direito de saber ou se recusar a saber o resultado da pesquisa.

Cada nova pesquisa necessitará de novo TCLE.

Deve-se descrever no TCLE por quanto tempo a amostra será guardada e como será descartada (ex: riscos ao meio ambiente?).

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Não há considerações.

Instituição Co-Participante: Hospital de Clinicas da UFPR.

CURITIBA, 16 de Abril de 2012

---

Assinado por: Claudia Seely Rocco

## ANEXO 2

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelos participantes da pesquisa.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Mauren Isfer Anghebem Oliveira e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, paciente com diabetes atendido no Serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado “Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes *mellitus* tipos 1, 2 e gestacional”, que vai pesquisar a presença de formas solúveis desse receptor no seu sangue. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é procurar novos exames para melhor controlar e monitorar o paciente com diabetes e ainda conhecer os fatores que levam o paciente diabético a ter maior ou menor risco para complicações vasculares, como o pé diabético, a cegueira e o infarto do coração.
- b) Caso você participe da pesquisa, seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) e dados sobre resultados de exames (exames de sangue, histórico clínico) serão repassados para os pesquisadores pelo seu médico. Além disso, será necessário coletar uma amostra de seu sangue.
- c) O sangue será coletado durante o procedimento de coleta de rotina do serviço da Unidade de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR), após sua consulta médica, sem necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitos indivíduos como o Diabetes *mellitus* tipos 1, 2 e gestacional, 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento sobre o diabetes, 3) novas associações entre a presença das formas do receptor que pretendemos estudar e as complicações do diabetes. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças como o diabetes e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
 Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

- a) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: Mauren Isfer Anghebem Oliveira (mauren.isfer@ufpr.br) e Geraldo Picheth (gpicheth@ufpr.br), farmacêuticos, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- b) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento no serviço de Endocrinologia Diabética, que está assegurado.
- l) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como seu médico. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados no próprio serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR).
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- o) Caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, você terá o direito de saber ou se recusar a saber o resultado.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item “e”. Em relação ao item “o”, eu \_\_\_\_\_ (desejo/ não desejo) saber os resultados/descobertas feitas referentes à pesquisa.

**Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu sangue para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado para consentir ou não o novo uso de minha amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.**

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br
--

## ANEXO 3

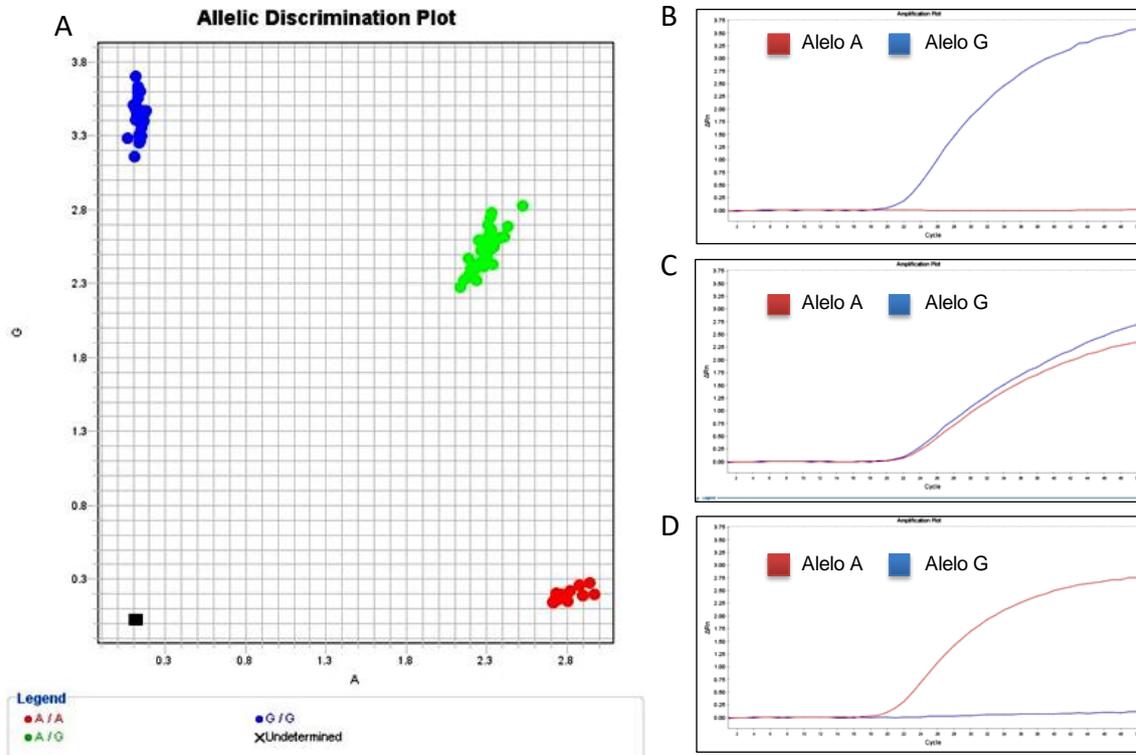
Questionário utilizado para coleta de dados dos pacientes.

## Planilha de coleta de dados:

Caracterização do Paciente		Data
Registro HC:		/ /
Nome:		
<b>Dados clínicos</b>		
N	Dados	Obs.
1	Idade	[ . ] anos
2	Peso	[ ] kg
3	Altura	[ ] cm
4	Etnia	(1)= Euro brasileiro (2)= Afro brasileiro (3)= Índio (4)= Oriental
5	Tipo de Diabetes	(1)= Tipo 1 (2)= Tipo 2 Tempo do início do DM; anos
6	Pressão Arterial (PA)	[ / ] mmHg Medicamentos para pressão:
7	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante
8	Histórico Obesidade	(1)= Sim (2)= Não pessoal
9	História familiar de diabetes	Pais: (1) = Sim (2) = Não Avós: (1) = Sim (2) = Não Demais familiares: (1)=Sim (2)= Não Quais:
10	História familiar de DAC	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
11	História familiar de Doença Tireoideana	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
12	Medicamentos:	<u>Descrever:</u> <u>Hipolipemiante</u> <u>Tireóide</u> <u>Hipoglicemiante:</u> <u>Insulina:</u>
13	Exames:	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: Creatinina Microalbuminúria: TSH: aTG aTPO Outros:
14	Outras patologias:	Doenças Autoimunes: (1)= Sim (2)= Não
15	Outras observações	

## ANEXO 4

Exemplo de PCR em tempo real para o SNP rs2228570 do gene *VDR*.



A) Gráfico de discriminação alélica do SNP rs2228570: em vermelho estão amostras homocigotas (genótipo AA); em verde, amostras heterocigotas (genótipo AG), e em azul amostras homocigotas (genótipo GG), em preto controle negativo. B) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo GG. C) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo AG. D) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo AA.