

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR) Y
DIABETES MELLITUS TIPO 1: ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON NIVELES
SÉRICOS DE VITAMINA D Y MARCADORES DE AUTOINMUNIDAD EN
POBLACIÓN CHILENA**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en Cumplimiento Parcial de los Requisitos

para Optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



Por

Diego Fernando García Díaz

**Julio, 2005
Santiago – Chile**

Director de Tesis: Dr. Francisco Pérez-Bravo

UCH-FC
G216
Biotecnología
C.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

“POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR) Y DIABETES MELLITUS TIPO 1: ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D Y MARCADORES DE AUTOINMUNIDAD EN POBLACIÓN CHILENA”

DIEGO FERNANDO GARCÍA DÍAZ

Dr. Francisco Pérez-Bravo

Director de Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Madeleine Lambrot Chastía

Presidente Comisión

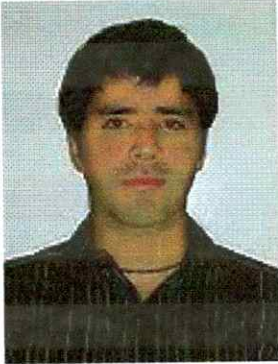
Dra. María Rosa Bono Merino

Profesor corrector



Santiago de Chile, Julio 2005

BIOGRAFÍA



Realicé mis estudios de educación básica y media en el colegio Saint Gaspar College de Santiago, desde 1986 a 1997. En este último año rendí la antigua PAA, donde obtuve el puntaje necesario para ingresar en el año 1998 a la carrera de Ing. En Biotecnología Molecular en Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Cursé 5 años de estudios, completando mi Licenciatura en el año 2003. En Agosto del siguiente año recibí mi certificado de título. Al iniciar el año 2004, comencé a trabajar en esta Tesis en el laboratorio de Epidemiología Genética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), bajo la dirección del Dr. Francisco Pérez-Bravo. A principios del presente año, finalicé mi trabajo experimental, y en el pasado mes de Julio rendí la primera parte de mi examen de grado.





AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a mi familia, porque gracias a ellos soy lo que soy. Gracias a ellos tuve acceso a muchas posibilidades. Les agradezco su total y completo apoyo al momento de las decisiones que he tomado en mi vida. Muchas gracias de verdad por haberme formado y por haberme dado el cariño y las herramientas para conseguir mis sueños.

A mi mamá gracias por ser como es ella, aunque nunca entendió bien lo que estudié y en lo que he trabajado este año, siempre encontró que lo hacía increíble. Por supuesto gracias por todo su esfuerzo cuando yo era niño, se que todo lo hizo por nosotros. Gracias por tu devoción incondicional hoy y siempre con tus hijos.

A mi papá, gracias por todo su esfuerzo durante toda su vida para que a mi y a mi hermano nunca nos faltara nada. Ahora creo que los dos estamos comenzando a pagar esa deuda, los dos alcanzamos nuestros ideales para esta etapa de la vida. Con esto espero podamos comenzar a saldar toda la dedicación que has tenido con nosotros.

A mi nana, mi abuelita, muchas gracias por haberme criado.

Gracias a todos mis grandes amigos y amigas de la U, de verdad es impresionante darse cuenta que encontraste gente tan afín con tus intereses. Son todos geniales y capaces, se que a todos les va a ir increíble en sus vidas. Gracias por todo el apoyo que me han dado, y muchas gracias a todos por haber estado con nosotros en el día más importante de nuestras vidas.

A mi nueva familia por haberme acogido hace ya dos años y medio. De verdad siento que tengo dos casas.

Al INTA, a todos los que compartieron conmigo, en el lab, en pichangas y en tantos partidos de tenis. Al Christian, gracias por ser mi partner incondicional de tenis. A la Bárbara, gracias por su buena disposición para responder siempre a mis dudas.

Gracias a la María Elena, por ser quien me ayudó cuando llegué a trabajar y quién me enseñó toda la práctica necesaria. Gracias por apoyarme también en las decisiones de mi vida personal. Gracias de verdad por haber sido mi compañera de trabajo y amiga todo este año y 4 meses.

Gracias a JL Santos, primero por su valioso apoyo estadístico para la realización de mi trabajo, y segundo, por darme la oportunidad más increíble de mi vida, que seguro va a determinar como esta va a ser de ahora en adelante.

Gracias a mi hermano, tremendo tipo, lejos una de las personas más inteligentes y capaces que conozco. Siempre voy a estar orgulloso de ti por todo lo que eres y lo que

quieres ser. Muchas gracias por ser haber sido tan importante para mí durante toda mi vida y para nosotros en este último tiempo. Nunca olvides que fuiste tu quién hizo que el día más importante de mi vida fuera perfecto.

Le doy gracias a mi tía, que antes de dejarnos nos dejó la unidad en mi familia cercana durante el tiempo en que realicé este trabajo. Gracias también por su ciega dedicación en vida para todos los que estaban a su alrededor.

Por supuesto, gracias a mi jefe, al Pancho. No se muy bien como agradecer todo lo que hiciste por mí este tiempo. Sólo se que a España me llevo todo lo que me enseñaste, y espero algún día ser, como profesional y persona, la mitad de lo que eres. Con eso me conformo.

A quién le debo todo es quién mueve mi vida. Gracias a mi esposa cumplo mis metas, y gracias a que ella está a mi lado, avanzo. Gracias a que camina conmigo día a día, aprendo. Gracias a todo lo que ella me admira, trato siempre de ser una mejor persona, para llenarla de orgullo. Tú sabes que nada de esto lo hubiera logrado sin todo tu apoyo. Gracias Carolina por darme el momento más importante de mi vida, el día en que juré que siempre voy a estar contigo.





*A mi esposa,
porque su amor me hace grande*

ÍNDICE DE CONTENIDO



BIOGRAFÍA	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	V
ÍNDICE DE CONTENIDO	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVIII
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes Generales	1
2. Incidencia Geográfica	3
2.1. Internacional	3
2.2. Chile	5
3. Susceptibilidad Genética	9
3.1. Riesgo Familiar	9
3.2. Sistema HLA Clase II	11
3.3. Otras Regiones de Susceptibilidad	13
3.4. VDR	14
4. Factores Ambientales de Riesgo	17
4.1. Virus	17
4.2. Nutrición	19
4.3. Otros	19
5. Autoanticuerpos	21
6. Vitamina D	22
6.1. Historia	22
6.2. Biosíntesis	22

6.3. Mecanismo de Acción	24
6.4. Función Ligada al Metabolismos de los Huesos	27
6.5. Función Inmunomoduladora	27
7. Inmunología de la Acción de la Vitamina D	30
8. Hipótesis	34
9. Objetivos	35
9.1 Generales	35
9.2 Específicos	35
II. MATERIALES Y MÉTODOS	36
1. Pacientes y Controles	36
2. Extracción de DNA y Obtención de Genotipos	36
3. Detección de Autoanticuerpos	38
4. Detección de Niveles Séricos de 25-Hidroxivitamina D	39
5. Análisis Estadístico	39
III. RESULTADOS	40
1. Frecuencias Genotípicas y Alélicas	40
2. Autoanticuerpos	42
3. Vitamina D	43
4. Genotipos Simples y Combinados más Frecuentes: Relación con Niveles de Autoanticuerpos y Vitamina D	43
5. Positividad de Autoanticuerpos y su Relación con Distribución Genotípica Específica y Niveles de Vitamina D	48
6. Relación entre Edad de Diagnóstico y Sexo con Distribución Genotípica, Niveles de Vitamina D y Presencia de Autoanticuerpos	50
IV. DISCUSIÓN	53
1. Evidencia Bibliográfica	53
2. Distribución Genotípica en Nuestro Grupo de Estudio	57
3. Marcadores de Autoinmunidad	58

4. Niveles Séricos de Vitamina D	59
5. Polimorfismos, Inmunidad y Vitamina D	61
6. Comentarios Finales	63
V. CONCLUSIONES	65
VI. BIBLIOGRAFÍA	67



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Incremento en la incidencia de DM1 en Santiago desde 1986 hasta 2003 (Carrasco 2005)	7
Tabla 2.	Tasas de concordancia (%) en estudios de poblacionales de enfermedades autoinmunes (Aho 1986, Kaprio 1992, Ebers 1994)	10
Tabla 3.	Locus con evidencia de asociación a DM1 (Hirschhorn 2003)	13
Tabla 4.	Principales factores ambientales putativos en la etiopatogénesis de la DM1 (Åkerblom 2002)	17
Tabla 5.	Distribución del polimorfismo Apa I en pacientes con DM1 y controles sanos	40
Tabla 6.	Distribución del polimorfismo Taq I en pacientes con DM1 y controles sanos	40
Tabla 7.	Distribución del polimorfismo Bsm I en pacientes con DM1 y controles sanos	41
Tabla 8.	Equilibrio de Hardy-Weinberg	42
Tabla 9.	Prevalencia de los autoanticuerpos anti-GAD e IAA en pacientes con DM1 y controles	42
Tabla 10.	Concentración sérica de 25-Hidroxivitamina D en casos y controles	43
Tabla 11.	Concentración sérica de 25-Hidroxivitamina D en casos y controles en los genotipos simples	44
Tabla 12.	Distribución de los genotipos dobles más frecuentes y niveles de concentración sérica de 25-Hidroxivitamina D en pacientes con DM1 y controles	45
Tabla 13.	Distribución de los genotipos triples más frecuentes y niveles de concentración sérica de 25-Hidroxivitamina D en pacientes con DM1 y controles	47
Tabla 14.	Niveles séricos de 25-Hidroxivitamina D según grupos de casos con presencia de los dos, de anti-GAD, de IAA o de ninguno de los autoanticuerpos	50



Tabla 15. Niveles séricos de 25-Hidroxivitamina D según grupo edad en casos
DM1

52



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Patrón Global de Incidencia de DM1 (Karvonen 1993, Hua 1994, LaPorte 1995)	4
Figura 2.	Principales grupos étnicos que componen la población Chilena (Cruz-Coke 1976)	7
Figura 3.	Polimorfismos del gen del VDR (Haussler 1998)	16
Figura 4.	Fotobiogénesis y vías metabólicas para la producción de vitamina D y su metabolismo (Marcus 2001)	23
Figura 5.	Dominios funcionales del VDR (Sutton 2003)	24
Figura 6.	Asociación temporal de los coactivadores durante la transcripción mediada por VDR (Sutton 2003)	26
Figura 7.	Representación esquemática de las acciones fisiológicas de la vitamina D respecto a salud cardiovascular, prevención de cáncer, regulación de la función inmune y disminución del riesgo a enfermedades autoinmunes (Holick 2004)	29
Figura 8.	Mecanismo de destrucción β celular en DM1 (Kawasaki 2004)	30
Figura 9.	Patrones de amplificación y restricción. A. Chequeo de amplificación. B. Patrón de restricción para el polimorfismo Apa I. C. Patrón de restricción para el polimorfismo Bsm I. D. Patrón de restricción para el polimorfismo Taq I	38
Figura 10.	Distribución porcentual de casos y controles para cada uno de los genotipos simples	41
Figura 11.	Distribución porcentual de los autoanticuerpos anti-GAD e IAA en cada uno de los genotipos simples de los casos con DM1	44
Figura 12.	Distribución porcentual de los autoanticuerpos anti-GAD e IAA en genotipos dobles de los casos con DM1	46
Figura 13.	Distribución porcentual de los autoanticuerpos anti-GAD e IAA en los genotipos triples más frecuentes de los casos con DM1	48



Figura 14.	Distribución porcentual genotípica de los casos DM1 según presencia de los dos, cualquiera de los dos o ninguno de los autoanticuerpos	49
Figura 15.	Distribución porcentual genotípica según grupo de edad en casos DM1	50
Figura 16.	Distribución porcentual de los autoanticuerpos según grupo de edad en casos DM1	51



LISTA DE ABREVIATURAS

1,25-(OH) ₂ D ₃	1,25-dihidroxivitamina D ₃
25-(OH)D ₃	25-hidroxivitamina D ₃
7-DHC	7-dihidrocolesterol
ABBOS	Péptido Inmunogénico derivado de BSA
AF-2	Dominio de Función de Activación Dependiente de Ligando
AMPc	Adenosin Monofostato Cíclico
APC	Células Presentadoras de Antígeno
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
BB	Ratón Bio-Breeding
BSA	Albumina Sérica Bovina
CMV	Citomegalovirus
CTLA-4	Antígeno Asociado al Linfocito T Citotóxico 4
CV	Coefficiente de Variación
DBD	Dominio de Unión a DNA
DC	Dicigótico
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DRIP	Proteínas de Interacción al Receptor de Vitamina D
EMC	Encefalomiocarditis
GAD	Descarboxilasa del Ácido Glutámico
GMCSF	Factor Estimulante de Colonias Macrófago-Granulocito
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IA2	Proteína Tirosina Fosfatasa 2
IAA	Anticuerpo Antinsulina
IFN- γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleuquina 1 β
IL-1R	Receptor de Interleuquina Tipo 1

IL-2	Interleuquina 2
IL-4	Interleuquina 4
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IMC	Índice de Masa Corporal
INS	Insulina
LBD	Dominio de Unión a Ligando
MC	Monocigótico
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Células Natural Killers
NOD	Ratón Diabético No Obeso
NS	No Significativo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PTH	Hormona Pituitaria
RFLP	Polimorfismo del Largo de los Fragmentos de Restricción
RIA	Radioinmunoanálisis
RXR	Receptores X Retinoides
SD	Desviación Estándar
SP1	Factor de Transcripción Promotor Específico 1
SRC	Coactivador del Receptor Esteroidal
Tc	Linfocito T Citotóxico
TGF- β 1	Factor de Crecimiento Tumoral β 1
Th	Linfocito T Cooperador (helper)
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
TNF- β	Factor de Necrosis Tumoral β
UVB	Luz Ultravioleta B
VDR	Receptor de Vitamina D
VDRE	Elemento de Respuesta a Vitamina D

Unidades

mL	Mililitro
μ L	Microlitro
$^{\circ}$ C	Grados Celsius
U	Unidades de actividad
pb	Pares de bases
Kb	Kilobases
Kda	Kilodaltons
U/mL	Unidades por mililitro
ng/mL	Nanogramos por mililitro

RESUMEN

La Diabetes Mellitus Tipo 1 es una enfermedad de base autoinmune que se manifiesta debido a la progresiva destrucción de las células β pancreáticas productoras de insulina. La etiología de esta enfermedad es muy amplia e incluye diversos factores ambientales y genéticos lo que concuerda con su divergente prevalencia en distintas poblaciones étnicas. Diversos polimorfismos del gen del receptor de vitamina D (VDR) han sido asociados en la etiología de enfermedades de origen autoinmune, entre ellas este tipo de Diabetes. Desde hace pocos años el papel inmunosupresor de la vitamina D ha generado importantes discusiones relacionadas a la producción de citoquinas y a la regulación de la secreción insulínica, y se ha determinado también que estas funciones las ejerce a través de su receptor. El propósito del presente estudio fue analizar la frecuencia de tres polimorfismos del gen VDR (Taq I, Apa I, Bsm I) por PCR-RFLP, estimar la concentración sérica de 25-hidroxivitamina D y detectar la presencia de dos autoanticuerpos marcadores de Diabetes tipo 1, anti-Descarboxilasa del ácido glutámico (anti-GAD) y anti-Insulina (IAA), (por Radioinmunoanálisis) en niños diabéticos de reciente diagnóstico y niños controles de la población Chilena. Los genotipos bb ($p = 0,0282$) y TTbb ($p = 0,0115$) se presentaron de manera más frecuente en controles, mientras que los genotipos TTBb ($p = 0,0014$) y AABbTT ($p = 0,0056$) en cambio, se presentaron más frecuentes en los diabéticos. Los dos autoanticuerpos se relacionaron positivamente con la presencia de Diabetes (42,02% de anti-GAD y 53,78% de IAA en casos, todos los controles negativos). Los niveles serológicos detectados de vitamina D

en el estudio en general no presentaron diferencias significativas entre casos y controles ($p = 0,6637$), sólo se observaron bajas en su concentración en algunos genotipos aislados (AABbTT y aabbTT; $p = 0,0056$ y $p = 0,0990$ respectivamente vs. controles) y en el grupo de diabéticos de menor edad (casos de 0 – 4 años vs. casos de 10 – 14 años, $p = 0,0337$). Se observó también una relación entre mayores títulos de IAA y el grupo de menor edad de los casos (68,4 % de casos de 0 – 4 años vs. 37,5 % de casos de 10 – 14 años, $p = 0,05$). Los resultados sugieren una relación marginal de los polimorfismos del gen del VDR con la enfermedad para nuestro grupo de estudio. También sugieren que los autoanticuerpos anti-GAD e IAA califican como marcadores de Diabetes Tipo 1 y que parece presentarse un grado de insensibilidad respecto a la vitamina D, salvo en aquellos pacientes que presentaron un inicio clínico temprano de la enfermedad. Este último hecho podría indicar que la hormona se encuentra ligada en algún nivel a inmunosupresión de una destrucción autoinmune más agresiva.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes Mellitus is an autoimmune disease that it manifested by the progressive destruction of insulin producers pancreatic β cells. The Etiology of this disease is wide and includes diverse environmental and genetic factors, this match with the divergent prevalence found in different ethnic populations. Diverse polymorphisms of the vitamin D receptor gene (VDR) have been associated with the etiology of autoimmune diseases, including this type of diabetes. In the last years, the immunosuppressor role of vitamin D it has generated important discussions related with cytokine production and insulin secretion regulation, and also it has been determined that this functions are executed through their receptor. The aim of this study was to analyze the frequency of three VDR gene polymorphisms (Taq I, Apa I, Bsm I) by PCR-RFLP, estimate the serological concentration of 25-hydroxyvitamin D and detect the presence of Type 1 Diabetes marker autoantibodies, against glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) and against insulin (IAA) (by radio-immune-assay) in diabetic children with recent diagnosis and healthy controls from Chilean population. The bb ($p = 0.0282$) and TTbb ($p = 0.0115$) genotypes were more frequent in healthy subjects, meanwhile the TTBb ($p = 0.0014$) and AABbTT ($p = 0.0056$) genotypes were more frequent in the diabetic patients. Both markers autoantibodies chosen were positively related with the disease (42.02% anti-GAD y 53.78% IAA in cases, all controls negative). The vitamin D serological levels detected in this study in general did not shown significant differences between cases and controls ($p = 0.6637$). We observed low serological concentrations just in some

genotypes (AABbTT y aabbTT; $p = 0.0056$ y $p = 0.0990$ respectively vs. healthy controls) and in the youngest group of diabetics (cases from 0 – 4 years of age vs. cases from 10 – 14 years of age, $p = 0.0337$). Also we observed a relationship between high titles of IAA and the youngest group of the cases (68.4 % in cases from 0 – 4 years of age vs. 37.5 % in cases from 10 – 14 years of age, $p = 0.05$). The results suggest a marginal relationship between the polymorphism and the disease for our study group. Also, suggest that the anti-GAD and IAA autoantibodies qualified as a Type 1 Diabetes markers and it seems it could be present an insensitivity degree related to vitamin D, but not in those patients that presented an early debut of the disease. This fact could indicate that the hormone it is linked indeed in some level to immunosuppression of a more aggressive autoimmune destruction.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes Generales

La Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) es una enfermedad compleja caracterizada por la destrucción autoinmune y progresiva de las células β pancreáticas productoras de insulina, generando insulinopenia e hiperglicemia características de la enfermedad lo que posteriormente deriva en el inicio clínico de la enfermedad y que provoca una total dependencia al suministro de insulina para la sobrevivencia. Diversos factores tanto genéticos (como numerosos genes involucrados en la respuesta inmune), como medio ambientales (Virus, dieta, por ejemplo) han sido generalmente aceptados como los principales participantes en este proceso autoinmune que desencadena el inicio de la diabetes (Atkinson 1994). Como resultado de esta etiología multifactorial, las tasas de incidencia de la enfermedad varían considerablemente entre distintas poblaciones étnicas (Serrano-Ríos 1999).

La DM1 es una de las dos formas mayoritarias conocidas de Diabetes y se diferencia de la Diabetes Tipo 2 (DM2) debido a que posee como característica principal una necesidad obligatoria de administración de insulina exógena (insulino-dependiente). La DM2 o Diabetes no-insulino-dependiente en cambio, se manifiesta por la imposibilidad del organismo de una respuesta adecuada a la acción de la insulina secretada por el páncreas y no directamente a la destrucción de las células β (WHO 2002). La

sintomatología en ambos tipos de Diabetes también es distinta. La DM1 se desarrolla con mayor frecuencia en niños y adolescentes de hasta 19 años de edad lo que representa entre el 10% y el 15% de los casos totales de Diabetes, mientras que la tipo 2 se manifiesta mayoritariamente en adultos y abarca a casi la totalidad del resto de los diabéticos. A pesar de lo último, los gastos socioeconómicos, psicológicos y comunitarios paralelos a la enfermedad, detectados en Europa, son tanto o más altos que los calculados para la DM2 (Songer 1992). Debido al ascenso que ha experimentado la incidencia de la enfermedad en nuestra población, se está volviendo más necesaria la investigación con miras a la optimización de los tratamientos vigentes y a la implementación de nuevas metodologías más eficaces de prevención.

La gama de marcadores de susceptibilidad caracterizados en la actualidad y el abanico de estímulos ambientales conocidos, no predicen con total exactitud el inicio de la sintomatología. Este hecho se puede notar de acuerdo al siguiente ejemplo: existen individuos a los que se les atribuye predisposición para desarrollar DM1, de acuerdo a la presencia de algunos marcadores genéticos de riesgo ya conocidos e incluso marcadores de autoinmunidad, y que no obstante nunca llegan a manifestar la enfermedad (Serrano-Ríos 1996, Pérez 1998). Esto demuestra lo difícil que continúa siendo hasta el día de hoy la detección de signos claves previos al desarrollo de la enfermedad que permitan la identificación de individuos que son susceptibles.

2. Incidencia Geográfica

2.1. Internacional

El patrón global de incidencias de la DM1 se encuentra ampliamente caracterizado en los registros generados por la investigación en cada población, lo que ha permitido observar que estas presentan una importante variación entre los distintos países y grupos étnicos (Figura 1). Se ha constatado una mayor ocurrencia de la enfermedad en países europeos (Caucasoides), concentrada principalmente en las poblaciones del norte de ese continente; y a su vez la evidencia recopilada sugiere que es baja en la mayoría de las otras etnias, dentro de las cuales se incluyen la raza negra y países tales como China y Japón. Estos últimos poseen incidencias de hasta 60 veces menores que las presentes en poblaciones europeas de alto riesgo. Así, es interesante el hecho de que países de origen asiático u otras etnias de América (México, Chile, Perú) y las poblaciones con ancestro negroide (Colombia, Venezuela y Brasil) presenten incidencias considerablemente más bajas. Específicamente en la figura 1, se destacan las altas incidencias detectadas en países de origen caucásico como Finlandia (~35), Suecia (~25), Dinamarca (~22) y Noruega (~21), y las bajas incidencias correspondientes a países como la República de Corea (~1), México (~1), Japón (~2) y Cuba (~4).

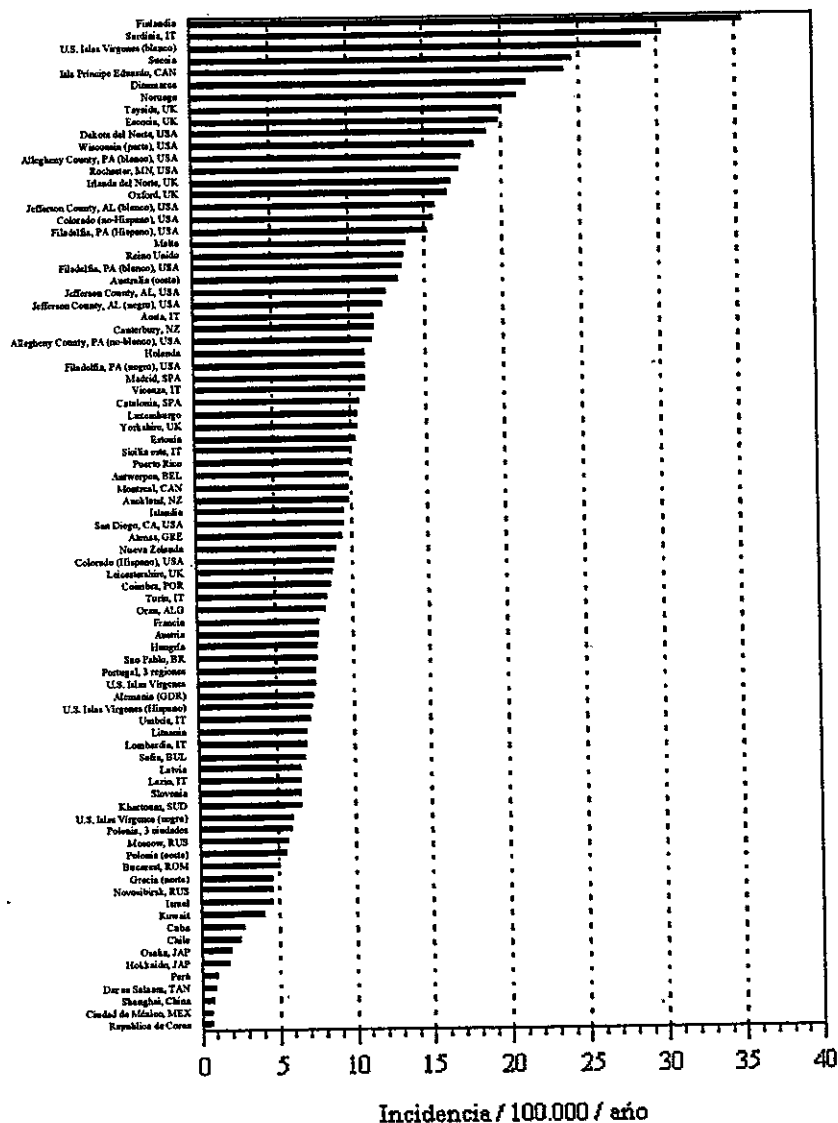


Figura 1. Patrón Global de Incidencia de DM1 (Karvonen 1993, Hua 1994, LaPorte 1995)

Esta disparidad en la incidencia de DM1 entre países y étnias podría indicar la presencia de fenómenos tales como: la contribución indiscutida del componente genético inherente a cada población, y segundo, tras un análisis exhaustivo de las diferencias geográficas, la contribución de las condiciones físicas de cada área o de las peculiaridades del estilo de vida de cada población, lo que modularía al primer

componente. De esto se extrae, por ejemplo, las diferencias estacionales que ocasionan mayor número de diagnóstico de casos nuevos en invierno, y aquellas que se manifiestan en países que se encuentran lejanos al Ecuador (como Finlandia y Noruega) a diferencia de los que se localizan cerca de él (como Cuba y Perú).

Por otra parte, diversos trabajos llevados a cabo en numerosas poblaciones alrededor del mundo han sugerido que la DM1 se encuentra en un claro y sostenido incremento. Un estudio que recolectó información a partir de 37 investigaciones realizadas en 27 países desde 1960 a 1996 apoya este hecho (Onkamo 1999). Este análisis demostró la presencia de un incremento promedio de 0,3% al año en la ocurrencia de la enfermedad, observándose un aumento significativo en 24 de las 37 poblaciones, indistintamente de si presentaban características de baja o alta incidencia poblacional. Incluso los autores predicen que para el año 2010 en Finlandia se van a alcanzar los 50 casos por 100.000 habitantes y que incluso se excederá de los 30 por 100.000 en muchas otras poblaciones.

2.2. Chile

La población chilena es una mezcla de habitantes que provienen de distintas partes del mundo. Esto se debió en sus inicios a las primeras expediciones militares españolas acontecidas en el siglo XVI. La población mestiza emergió debido a la mezcla generalizada entre la población originaria Amerindia (Mapuches y Aymaras en su mayoría) y los colonizadores ibéricos. En los siguientes siglos, nuevas migraciones desde Europa fueron motivadas para asentar población en la zona austral, provenientes

en su mayoría de Alemania e Italia, y también población negroide que llegó al norte del territorio. En el siglo XX, los cambios económicos y sociales del país forzaron a muchas personas a abandonar las zonas rurales y habitar el gran foco urbano, como lo fue y es aún Santiago y sus zonas aledañas. Todo esto contribuyó al desarrollo y distribución de la población chilena moderna, que en la actualidad presenta aproximadamente las siguientes proporciones: 60% de origen europeo, 33% de origen amerindio y 7% de origen Africano (Figura 2).

En el caso específico de Santiago, es interesante visualizar la tendencia socio-genética en su población, en donde el grado de mezcla genética varía en las diferentes clases socio-económicas (Valenzuela 1987).

En relación a la incidencia de la DM1, como se expuso en la sección anterior, esta varía considerablemente entre las distintas poblaciones, y específicamente en Chile el grado de mestizaje generado evidencia la evolución que esta ha presentado. Se ha verificado que la población Mapuche posee una muy baja incidencia de Diabetes infantil (0,43/100.000) (Larenas 1996) mientras que, por ejemplo, la población española de Madrid muestra una tasa de incidencia de 11,3/100.000 (Dorman 1996). La incidencia de la enfermedad en la Región Metropolitana de Santiago, el núcleo urbano de la población chilena, ha mostrado un fuerte incremento en los últimos 17 años, desde 2,5 casos por 100,000 habitantes en 1986 a 7,5 casos por 100,000 habitantes en el período 2003. De este modo, la DM1 paso a ser considerada desde una enfermedad de baja incidencia a una de incidencia intermedia (Tabla 1).

Periodo	Incidencia (Casos / 100.000 Hab.)
1986 - 1990	2,16
1991 - 1995	3,49
1996 - 2000	4,39
2001 - 2003	6,38

Tabla 1. Incremento en la incidencia de DM1 en Santiago desde 1986 hasta 2003 (Carrasco 2005)

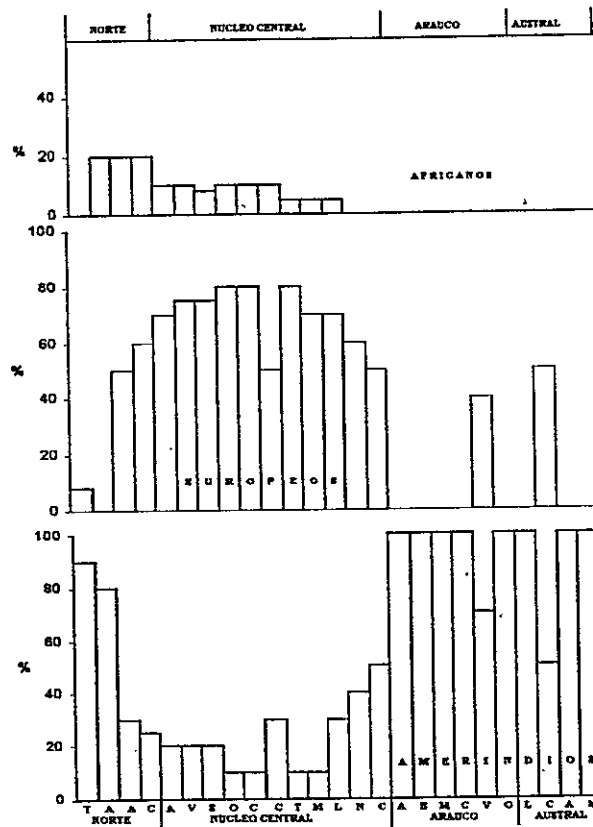


Figura 2. Principales grupos étnicos que componen la población Chilena. La figura representa a los tres grupos étnicos más importantes de nuestra población según zona geográfica (zona norte, central, sur y austral). El gráfico superior define la distribución de la población de origen negro-africano, el siguiente a la población de origen caucasico y el gráfico inferior define a la población nativa. (Cruz-Coke 1976)

Las causas de este incremento pueden atribuirse a diversos factores detonantes, como la constante mezcla con genes de etnias más susceptibles que confieren al “pool genético” en general un aumento en la vulnerabilidad y una baja de caracteres protectores, como también a cambios climáticos globales que determinan la permanencia más prolongada de las estaciones frías y en consecuencia la mayor exposición a brotes de infecciones virales y condiciones de estrés. Aunque la incidencia es aún menor a la detectada en países de origen netamente Caucásico, este incremento de la DM1 en Chile hace que esta enfermedad tome un mayor peso epidemiológico por lo que es, la enfermedad crónica más importante en los infantes.

3. Susceptibilidad Genética

3.1. Riesgo Familiar

Como ya se ha vislumbrado, en la actualidad la manifestación de la DM1 sólo es atribuible parcialmente a factores genéticos. Ante la ausencia de un gen marcador de la enfermedad, la contribución genética de los genes descritos es de baja penetrancia debido, probablemente al influjo existente de factores no-genéticos. Lo anterior, repercute en el grado de manifestación o expresividad génica, pues no todos los individuos están expuestos a estímulos similares, ni poseen caracteres genéticos comunes asociados a la enfermedad.

Sin embargo, la contribución génica presente es posible de observar según la siguiente evidencia: cerca del 80 % de los casos ocurren en individuos sin historia familiar de la enfermedad (WHO Diamond Project Group 1991). No obstante, el 20 % restante si muestra una indiscutida agregación familiar.

La frecuencia de DM1 a los 30 años de edad es de alrededor de 6 % en hermanos de pacientes diabéticos, y la frecuencia en la población en general es del 0,6 %. Por lo tanto, un hermano de diabético presenta una tendencia 10 veces mayor a manifestar DM1 que un niño o un adulto joven normal (Hawa 2002). Este incremento del riesgo sugiere que existe una contribución genética y no-genética compartida. Sin embargo, el

grado en que se encuentra involucrado el antecedente genético en la DM1, no fue posible de resolver hasta la aparición de los estudios realizados en gemelos.

Se sugiere la existencia de un efecto genético cuando las tasas de concordancia en gemelos monocigóticos (MC) exceden a las de gemelos dicigóticos (DC). La tabla 2 resume las tasas de concordancia obtenidas en estudios poblacionales realizados en gemelos para tres enfermedades autoinmunes. En todos los casos se observa que los MC son más concordantes respecto a la DM1 que los DC, lo que indica que la contribución genética si es importante. Otro punto destacable es que las tasas en DC para estas enfermedades son menores que el 50 % de aquellas presentadas en MC, lo que alude a un modelo poligénico (en el caso de un gen dominante, el riesgo para gemelos DC debe corresponder a la mitad del observado para MC. Cuando este valor no sigue esa proporción y la excede, indica un incremento en número de genes afines)

Enfermedad	Gemelos Monocigóticos	Gemelos Dicigóticos
Artritis Reumatoídea	12	4
Esclerosis Múltiple	26	2
Diabetes Tipo 1	13	3

Tabla 2. Tasas de concordancia (%) en estudios poblacionales de enfermedades autoinmunes (Aho 1986, Kaprio 1992, Ebers 1994)

Otros estudios concernientes a la DM1 corresponden a los realizados por Pyke en 1988. Estos mostraron concordancias en gemelos MC de 36 % y en DC e hijos de padres diabéticos de no más del 10 %, con una prevalencia de agregación familiar de un 15 %.

3.2. Sistema HLA Clase II

En los últimos 30 años, la contribución genética más fuertemente ligada a la susceptibilidad de DM1 corresponde a la región génica del antígeno del leucocito humano (HLA), mapeada en el brazo corto del cromosoma 6 (Todd 1987, Atkinson 1994, Vyse 1996). Esta región se ha convertido en blanco para un amplio número de estudios de asociación tanto en DM1, como en otras enfermedades autoinmunes, llevados a cabo por distintos institutos de investigación en el mundo entero (Pérez-Bravo 1995, Ilonen 1996, Nejentsev 1998).

Esta región del genoma codifica para moléculas de superficie de tres clases distintas (I, II y III). Estas pueden encontrarse en la mayoría de las células nucleadas y participar en la presentación de antígenos a linfocitos T citotóxicos (Tc) (clase I), estar presentes en linfocitos B, macrófagos, células T activadas y células dendríticas, y presentar antígenos a linfocitos T cooperadores (Th) (clase II) o formar parte de las moléculas del sistema del complemento (clase III) (Trucco 1989, Thorsby 1992, Jauser 1995). Las dos primeras clases son altamente polimórficas, naturaleza que ha permitido la tipificación de variantes genéticas entre individuos, lo que ha sido importante para el establecimiento de patrones de susceptibilidad o protección frente a enfermedades específicas.

Las asociaciones entre HLA y la DM1 se comenzaron a documentar en una primera instancia relacionando genes HLA de clase I (como B8 y B15) con la aparición de la

enfermedad (Nerup 1974). Posteriormente, con el descubrimiento de los genes de clase II (locus DR y DQ), el nexo se hizo aparente ya que estos exhibieron una asociación más potente.

Aproximadamente el 95 % de los pacientes con DM1 en la mayoría de las poblaciones poseen una mayor frecuencia de los alelos DR3 o DR4, e individuos que ostentan ambos son particularmente susceptibles (esta combinación se da en el 40 % de la población no diabética). También se ha considerado una asociación negativa con DM1 a la presencia del alelo DR2 en la mayoría de las poblaciones étnicas.

Respecto a la región DQ, se ha identificado que tanto la ausencia de aspartato en la posición 57 de la cadena HLA-DQB (Todd 1987), como la presencia de arginina en la posición 52 de HLA-DQA (Khalil 1990) estarían fuertemente ligadas a DM1, ya sea para protección o susceptibilidad. De esta forma, se han realizado estudios comparativos en distintas étnias donde se ha demostrado que el estado de riesgo conferido por los alelos de la cadena DQB (alelos *0302 y *0201) puede ser modulado por aquellos presentes en la cadena DQA (alelos *0301 y *0501). Estos hechos indican efectivamente que las variaciones en la estructura tridimensional de la molécula HLA tendrían importancia a la hora de establecer protección o predisposición y consecuentemente ser consideradas para el establecimiento de medidas preventivas.

3.3. Otras Regiones de Susceptibilidad

Sin embargo, muchas otras regiones que no corresponden a zonas MHC han sido identificadas como factores de predisposición, como lo son la región del gen de la insulina en el cromosoma 11 (INS) (Bell 1984, Hitman 1985), la del receptor de IL-1 en el cromosoma 2 (IL-1R) (Metcalf 1996) y la del antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) (Nistico 1996), entre otras (Tabla 3). Aunque los efectos observados son de mucho menor grado que aquellos relacionados al HLA, de todas formas proveen mayor información acerca de la etiología y la patogénesis de la DM1, y podrían ser considerados para el establecimiento de genotipos de riesgo.

Gene/ Locus	Variant(s)
HLA (human leukocyte antigen, MHC)	See text
INS (insulin)	VNTR class I alleles
CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)	Thr17 Ala
ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1)	Lys469Glu
IFNG (interferon γ)	CA repeat, intron 1
IGHV2-5 (Ig heavy chain variable region 2-5B)	Allele 3.4
IL1R1 (interleukin-1 receptor type 1)	PstI RFLP
IL12B (interleukin 12B)	3' UTR allele 1
IL6 (interleukin 6)	- 174C/G
NEUROD1 (neurogenic differentiation 1)	Ala45Thr
SELL (L- selectin)	T688C
VDR (vitamin D receptor)	BsmI and ApaI RFLPs
WFS1 (wolframin)	Arg456His

Tabla 3. Locus con evidencia de asociación a DMI (Hirschhorn 2003)

Cabe destacar de este grupo, un locus que en los últimos años se ha convertido en eje de motivación para un gran número de estudios. Estas investigaciones se han enfocado en analizar una posible relación entre la DM1 y polimorfismos del gen del receptor de vitamina D (VDR).

3.4. VDR

El gen del VDR humano fue descubierto en 1969 (Haussler 1969) y fue clonado y secuenciado en 1987 (McDonnell 1987, Baker 1988). Se ubica en el brazo q del cromosoma 12, específicamente en la región 12cen-q12 (Taymans 1999). Es de aproximadamente 75 kb de largo y se encuentra conformado por 11 exones con sus intrones internos respectivos. Tres exones (1a, 1b y 1c) se encuentran en la región no-codificante 5', y los 8 restantes (2-9) codifican para la región estructural del producto.

La región promotora del gen es rica en residuos GC y no contiene caja TATA. También presenta sitios de unión para SP1 y variados factores de transcripción. Este promotor dirige la síntesis de por lo menos 3 transcriptos distintos de ARNm resultado de splicing alternativo en los exones 5' no-codificantes (Miyamoto 1997, Crofts 1998). El exón 2 contiene 2 pares de bases de secuencias no-codificantes, el codón de inicio de la traducción y el dominio N-terminal para un primer dedo de zinc. Un segundo dedo de zinc se codifica a partir del exón 3. Los exones 4 y 5 codifican para una región denominada "bisagra" entre los dominios de unión a DNA y de unión a la hormona, el exón 6 para el resto de la "bisagra" y para la primera porción del sitio de unión a esteroides, y por último, los exones 7 a 9 codifican para la porción C-terminal y la región 3' no-traducida (Miyamoto 1997).

El gen del VDR se encuentra regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional por los sistemas protein kinasa A y protein kinasa C. Los niveles del receptor están

determinados por la estabilización inducida por el ligando. La regulación diferencial a nivel del promotor del gen y el splicing alternativo podrían estar involucrados en las funciones específicas de la vitamina D en los distintos tipos celulares que poseen el receptor (Christakos 1996, Miyamoto 1997, Jones 1998, Kato 2000).

Estructuralmente este gen es miembro de la superfamilia de receptores nucleares esteroideos activados por factores de transcripción (McDonnell 1987, Baker 1988), compuesta por cerca de 150 miembros dentro de los cuales se incluyen receptores para glucocorticoides, mineralocorticoides, hormonas sexuales, hormona tiroidea y para metabolitos de vitamina A o retinoides. Sin embargo, el VDR exhibe diferencias únicas y específicas respecto a este grupo (Horst 1997, Jones 1998).

Numerosos polimorfismos han sido descritos para este gen, los que a través de los años se han asociado a distintas enfermedades a través de diversos estudios poblacionales (Carling 1997, Kohama 2000, Ozaki 2000, Simmons 2000, Okita 2002). En relación al presente trabajo, muchas investigaciones se han enfocado específicamente en asociaciones con DM1. Esto se ha concebido como consecuencia de las cuantiosas propiedades funcionales atribuidas a la vitamina D, las que se discutirán en un capítulo posterior.

Dentro de estos polimorfismos del gen VDR, cuatro han sido bien caracterizados y estudiados extensamente. Estos corresponden a variaciones en los sitios de corte específicos para cuatro enzimas de restricción: Fok I, Apa I, Bsm I y Taq I (Figura 3).

El sitio de restricción Fok I se localiza en el codon de inicio del exon 2 y es el único polimorfismo de estos cuatro que se traduce en una diferencia estructural debido a su presencia o no en el gen, así el VDR se conforma de 424 aminoácidos cuando el sitio no se encuentra presente (genotipo F) y de 427 aminoácidos cuando si está (genotipo f). Otros dos polimorfismos se encuentran en el intron comprendido entre los exones 8 y 9, y corresponden a los revelados por las endonucleasas Apa I y Bsm I. El último polimorfismo del grupo se ubica en las secuencias 3' no codificantes del exon 9, específicamente en el codon 352 silente, y fue caracterizado por medio de la enzima Taq I. Al igual que para Fok I, los genotipos obtenidos para estos tres últimos polimorfismos son designados por letras minúsculas cuando existe un sitio de restricción y con letras mayúsculas cuando no, en este caso, "b" y "B", "t" y "T", "a" y "A" para Bsm I, Taq I y Apa I, respectivamente.

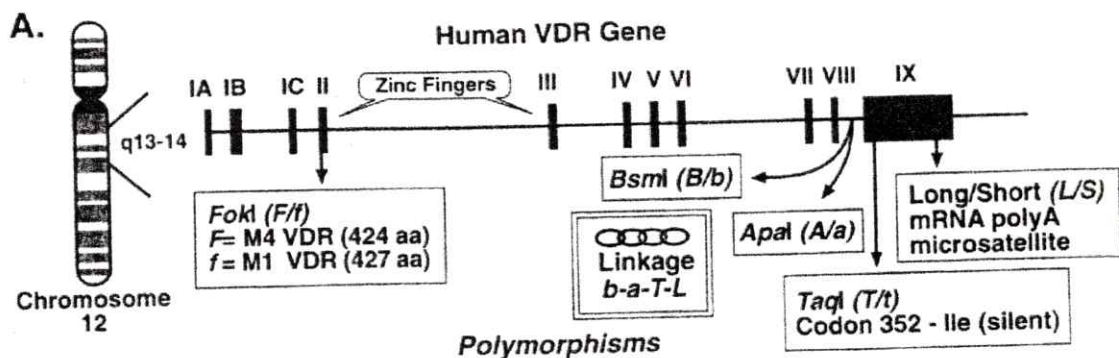


Figura 3. Polimorfismos del Gen del VDR (Haussler 1998)

4. Factores Ambientales de Riesgo

Los estudios en gemelos expuestos anteriormente señalan que el componente genético es necesario en la etiología de la DM1, pero no suficiente. Es así como se postula que el inicio del proceso autoinmune en la DM1 se podría suceder mediante un complejo mecanismo inmunológico que involucra ruptura de la tolerancia, mediante la presentación de un péptido diabetogénico, o a través de mimetismo molecular antigénico (Xiao, 1997, Dosch 1999). Numerosos estímulos medio ambientales se han propuesto como factores importantes en la destrucción β -celular, conduciendo ya sea en forma lítica o por medio de inducción autoinmune la ruptura de tolerancia en individuos genéticamente susceptibles (Tabla 4).

Infecciones virales

Factores dietarios

Crecimiento

Toxinas

Factores ante- y perinatales

Condiciones de estrés

Combinación de factores ambientales

Tabla 4. Principales factores ambientales putativos en la etiopatogénesis de la DM1 (Åkerblom 2002)

4.1. Virus

Muchos estudios han sugerido que ciertas infecciones virales pueden jugar un rol importante en la patogénesis de la DM1. La rubéola congénita corresponde al ejemplo clásico de Diabetes generada por infecciones, pero esta debido a los rigurosos planes

inmunológicos en países occidentales fue prácticamente eliminada. Hoy por hoy, los candidatos más fuertes corresponden al grupo de los enterovirus. Entre estos se destaca el virus Coxsackie B, el cual ha sido aislado desde suero de pacientes de diagnóstico reciente (Wagenknecht 1991, King, 1983), así como también se han detectado anticuerpos contra este virus de manera más frecuente en diabéticos que en controles sanos (Gamble 1969). Todo esto se comprobó definitivamente en el año 1979 al aislar el virus Coxsackie B4 desde el páncreas de un niño que murió por cetoacidosis diabética, y al observar que al transferirlo a una cepa de ratón susceptible causó Diabetes (Yoon 1979). Se propone que el mecanismo de inicio de este proceso se podría generar por medio de mimetismo molecular en donde el virus induce la fabricación de anticuerpos que llevaría a la destrucción de las células β a través de una reacción cruzada con el autoantígeno GAD 65 kD, que es una proteína que se encuentra tanto en la superficie del virus como en la de las células β pancreáticas (Jones 1995, Solimena 1995). Lo mismo ocurriría en el caso de otros virus, como el citomegalovirus (CMV), donde se generan anticuerpos que reaccionan contra otro componente de superficie (autoantígeno 38 KD) (Ward 1979). Otros como el de la encefalomiocarditis (EMC) y el de la parotiditis, actuarían ya sea modificando antígenos de superficie de las células pancreáticas, provocando desbalances en el sistema inmune al atacar a linfocitos T cooperadores o supresores, o del mismo modo señalado anteriormente por medio de mimetismo y reacción cruzada. Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de los casos de DM1 no muestran evidencias de infecciones virales recientes al momento del diagnóstico (Yoon 1986).

4.2. Nutrición

Distintos factores dietarios han sido asociados con el desarrollo de DM1. Dentro de estos se incluyen proteínas de la leche de vaca, como la albúmina bovina (BSA), que presenta homologías secuenciales entre una sección propia de 17 aminoácidos denominada péptido ABBOS y el antígeno ICA69 de la superficie de las células del islote, y otras como la β -lactoglobulina y la β -caseína (Karjalainen 1992, Cavallo 1996, Vaarala 1996). Del mismo modo, el gluten y las gliadinas del trigo (Elliot 1984), y por último deficiencias en la ingesta de vitamina D. Todas estas indagaciones han tenido como soporte principalmente experimentos llevados a cabo en modelos animales (ratones BB y NOD). Son claves para el presente estudio los trabajos realizados por el grupo de Mathieu y uno muy importante efectuado en 1999 que involucró a 7 centros investigativos de Europa. Ambos indicaron que tanto en modelos animales, como en grupos de niños diabéticos (al compararlos a su contraparte sana), los bajos niveles corporales de la hormona contribuyen a un riesgo incrementado a DM1 (Mathieu 1992, Mathieu 1994, The EURODIAB Substudy 2 Study Group, 1999).

4.3. Otros

Existen otros factores ambientales que han sido en alguna instancia relacionados a DM1: el crecimiento (una alta velocidad de crecimiento en la niñez en poblaciones Europeas podría estar ligado a la enfermedad) (Hyppönen 1999, Bruining 2000), toxinas como los compuestos N-nitrosos (ingestas de nitratos y nitritos en comidas y agua

potable también podrían estar relacionadas) (Virtanen 1994), el antibiótico Bafilomicina A1 (Myers 2001), factores ante y perinatales (se postula probablemente por una incompatibilidad de grupos sanguíneos madre-hijo lo que desencadenaría la autoinmunidad, y también por una edad avanzada de las madres al momento de concebir) (Dahlquist 1992, Bingley 2000), eventos de estrés (factores psico-sociales) (Åkerblom 2002) y por supuesto la combinación de estos.

5. Autoanticuerpos

El proceso de desarrollo de la DM1 es gradual, pudiendo ser necesarios varios años antes de que esta enfermedad se manifieste clínicamente. No se conoce con certeza el mecanismo de este proceso de destrucción de la célula β , pero existe amplia evidencia que relaciona esta reacción autoinmune con una serie de eventos celulares, como la presencia de infiltrados mononucleares en el islote pancreático (Gepts 1965, Gepts 1978, Foulis 1986), y también eventos humorales reflejados principalmente con la aparición de marcadores de autoinmunidad característicos. Estos se refieren específicamente a anticuerpos contra proteínas de superficie de la célula β , como la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65) (Baekkeskov 1982), también a aquellos dirigidos contra una tirosina fosfatasa presente en el interior de las células β (IA2) (Rabin 1994) y con anticuerpos contra la propia insulina (IAA) (Palmer 1983). En el momento del diagnóstico estos anticuerpos se encuentran presentes en una alta frecuencia en los casos diabéticos: IAA en 30-40%, anti-GAD en 80-90% y anti-IA2 en alrededor de 65% (todos con una muy baja positividad en controles sanos) (Baekkeskov 1982, Arslanian 1985, Betterle 1987, Kaufman 1992, Pietropaolo 1998, Leslie 1999). Además, estos anticuerpos pueden ser detectados en el suero de los pacientes en un período de meses y hasta años antes del desarrollo de la enfermedad lo que los ha convertido en marcadores de un estado conocido como prediabetes.

6. Vitamina D

6.1. Historia

Antes del descubrimiento de la vitamina D, un alto porcentaje de niños que vivían en zonas templadas urbanas presentaban raquitismo. Algunos investigadores creían que se debía una falta de aire fresco y de luz solar, y otros sugerían que esto dependía de factores ausentes en la dieta. En 1920 se demostró que ambas tesis eran correctas al adicionar aceite de hígado de bacalao a la comida de los niños y al aumentar el tiempo de exposición a la luz solar, lo que prevenía y curaba la enfermedad. Estos fueron los primeros pasos para el descubrimiento de esta hormona que hoy en día es encasillada dentro del grupo de hormonas esteroidales y es de conocimiento general su bien establecido rol en la salud de los huesos, y además los nuevos efectos benéficos para el organismo que poseería junto a la regulación en la homeostasis de calcio sugeridos en los últimos años (Holick 2004).

6.2. Biosíntesis

La forma bioactiva de la vitamina D es la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($1,25$ - $(OH)_2 D_3$) y es obtenida en el organismo por hidroxilaciones secuenciales de la vitamina D_3 , un precursor que es obtenido desde la dieta (aceite de pescado, salmón, sardinas, leche, jugo de naranja, suplementos vitamínicos) o desde la exposición a los rayos del sol (Holick 2004), siendo la segunda la fuente más importante de esta hormona para el

organismo. La vitamina D₃ (colecalfiferol) es sintetizada en la piel a partir de su precursor, el 7-dihidrocolesterol (7-DHC) por medio de la exposición a la radiación UVB (Figura 4).

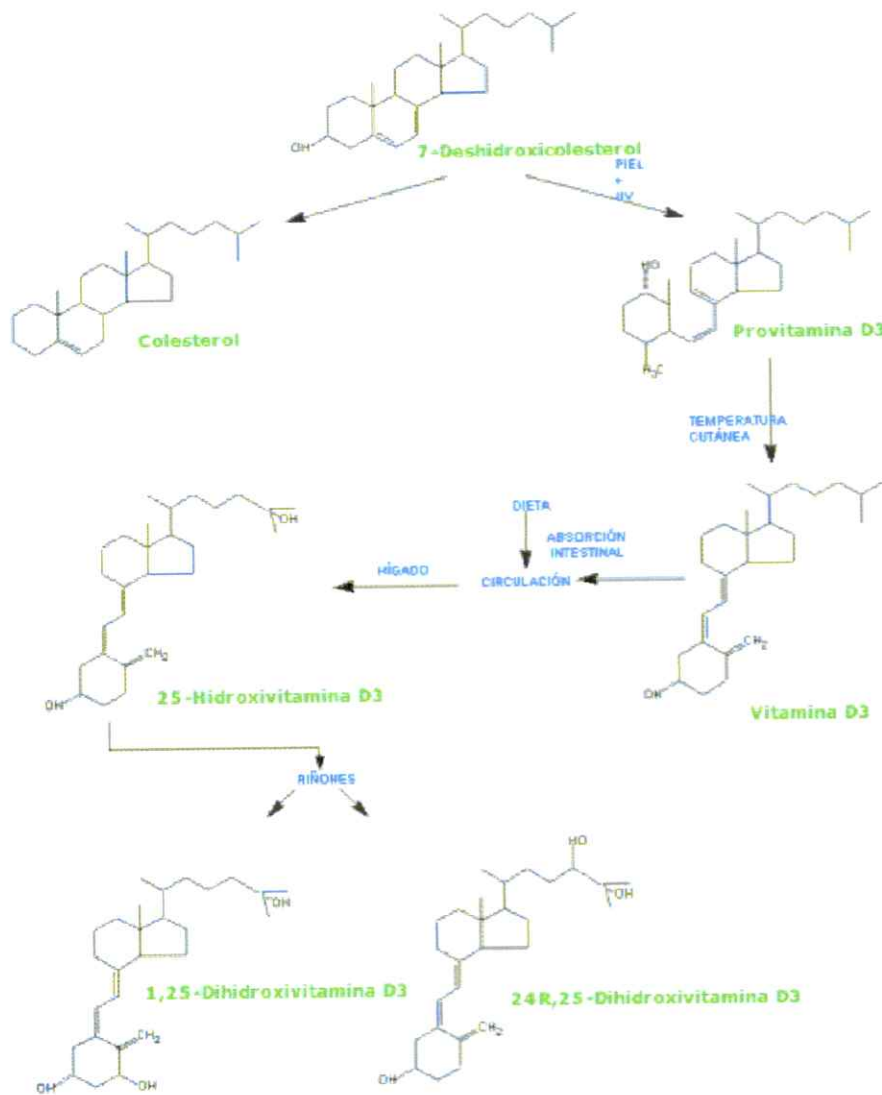


Figura 4. Fotobiogénesis y vías metabólicas para la producción de vitamina D y su metabolismo (Marcus 2001)

Luego la vitamina D₃ sufre la primera de dos hidroxilaciones en el hígado por medio de la enzima vitamina D-25-hidroxilasa para producir la 25-hidroxivitamina D₃ (25-OH-D₃) que es la forma preponderante en la circulación y también la estructura de almacenamiento de la vitamina D en mamíferos, y que refleja el status de la ingesta de la hormona en el organismo. Y finalmente la 25-OH-D₃ es el sustrato para el segundo paso de hidroxilación en el riñón por acción de la 1 α hidroxilasa (estimulada por la PTH vía AMPc), que conlleva a la producción de su forma principalmente activa, 1,25-(OH)₂D₃

6.3.- Mecanismo de Acción

Las acciones biológicas de 1,25-(OH)₂ D₃ son mediadas a través del VDR, un receptor nuclear de aproximadamente 50-60 KDa (dependiendo de la especie) y que pertenece a la superfamilia de factores ligados activados de transcripción (Figura 5).

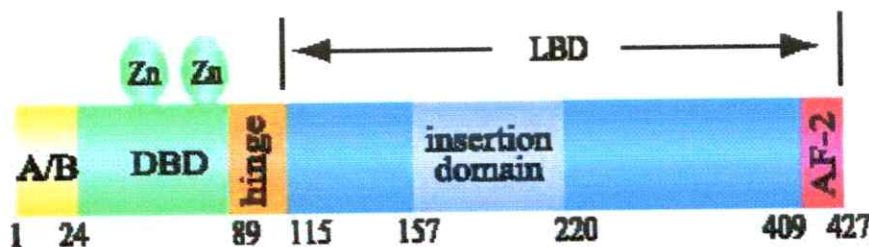


Figura 5. Dominios funcionales del VDR (Sutton 2003)

Este receptor posee un dominio amino-terminal A/B hipervariable relativamente corto en relación a la mayoría de los otros receptores esteroidales. Posee también una región

de unión a DNA (DBD) (que sí es similar al resto la superfamilia de estos receptores) que se caracteriza por la presencia de dos dedos de zinc que son los median la unión secuencia-específica del receptor a los elementos de respuesta a vitamina D (VDRE) en el DNA (que consisten en dos secuencias AGGTCA repetidas separadas por pares de bases no específicos) (McDonnell 1989). También posee una región de unión a ligando (LBD) (que también presenta semejanzas respecto a esta superfamilia), que es la que media la unión con la vitamina D, formación de heterodímeros con otros receptores (como los receptores de retinoides), y con factores de transcripción (McDonnell 1989, Nakayima 1994, Masuyama 1997). Además, esta región contiene un dominio AF-2 que se reconoce como crítico para la transcripción, ya que la remoción de este resulta en una disminución de la afinidad de unión a ligandos y pérdida de activación transcripcional. Además, posee una región que funciona como bisagra (que conecta los dominios LBD y DBD y que se denomina "linkage") que le confiere flexibilidad rotacional a la molécula lo que permite su dimerización e interacción con el DNA (Mangelsdorf 1995). Por último, posee un dominio de inserción en la región LBD entre los aminoácidos 157 y 220, aunque se ha demostrado que su ausencia no altera la unión normal a ligandos y no distorsiona sus propiedades de transactivación *in vitro* (Rochel 2001).

La unión de la hormona al receptor aumenta la afinidad de este con el receptor de retinoides (RXR) (formación de un heterodímero), unión que da como resultado un cambio conformacional del dominio C-terminal del VDR, permitiendo así que el dominio AF-2 reclute e interactúe con otros factores de transcripción, tales como los coactivadores de receptores esteroidales (SRC) y CBP/p300. En caso de regulación

positiva, provoca la unión del heterodímero al VDRE por una parte y la acetilación de histonas (por cofactores como el CBP/p300) que permiten la aparición del templado abierto de cromatina por otra, lo que induce un plegamiento en la región promotora y la unión del complejo de proteínas de interacción al receptor de vitamina D (DRIP), hechos que abren el paso para la entrada de la maquinaria transcripcional (Figura 6).

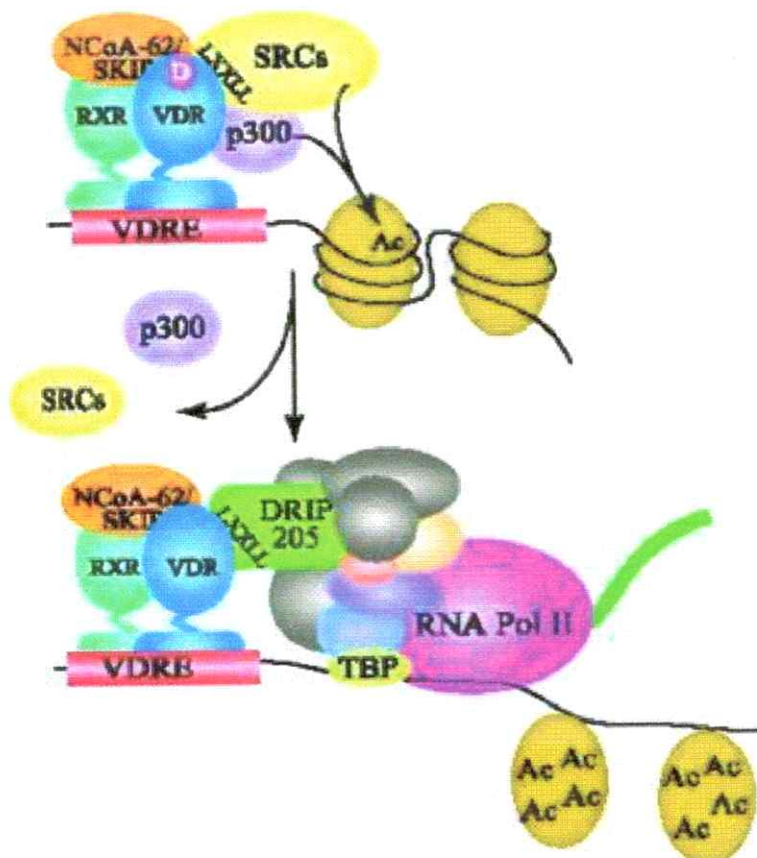


Figura 6. Asociación temporal de los coactivadores durante la transcripción mediada por VDR (Sutton 2003)

6.4. Función Ligada al Metabolismo de los Huesos

La vitamina D actúa directamente en el intestino delgado para incrementar la absorción de calcio y fósforo al lumen (rol conjunto con la hormona pituitaria, PTH). También estimula a los osteoblastos a diferenciarse para que posteriormente estos medien la formación de depósitos de calcio en la matriz (Owen 1991). En un estado de hipocalcemia, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ induce a los preosteoclastos a madurar en osteoclastos para la movilización de calcio desde el hueso y para incrementar la eficiencia de la absorción de fosfato (Bar-Shavit 1983). Todas estas acciones son necesarias para mantener una adecuada mineralización esquelética.

6.5. Función Inmunomoduladora

Existe evidencia de que el receptor de vitamina D se encuentra en una amplia gama de tejidos y células, como por ejemplo en corazón, estómago, páncreas, cerebro, piel, gónadas y en linfocitos T y B activados (Stumpf 1979, Manolagas 1985, Mathieu 2002). Por lo tanto, no es sorprendente que la vitamina D cumpla una gran cantidad de funciones biológicas que van más allá del metabolismo de calcio y fósforo (Figura 7) (DeLuca 2001, Holick 2002).

La vitamina D tiene la capacidad de regular el crecimiento de células hiperproliferativas e inducir las a diferenciarse, así esta hormona conduce importantes efectos sobre células cancerosas, generando depresión en su nivel proliferativo, como células de

osteosarcoma, melanoma, cáncer de mama, colon y próstata. (Garland 1989, Ahonen 2000, Holick 2002, Holick 2004). También tiene un efecto respecto a la manifestación de hipertensión (Rostand 1979) y sobre los keratinocitos de la piel (inhibiendo su diferenciación) hecho que ha catalogado a la vitamina D como una importante herramienta para combatir la psoriasis (MacLaughlin 1985, Holick 1998). Por otro lado, esta hormona liposoluble actúa como moduladora del sistema inmune (Jones 1998), un rol ya antes sospechado debido a la presencia de su receptor en células inmunitarias, como por ejemplo en linfocitos T, linfocitos B y en macrófagos activados. Enfermedades autoinmunes comunes como la artritis reumatoidea, la esclerosis múltiple, el lupus y la Diabetes Tipo 1 han logrado ser prevenidas en parte o prácticamente en su totalidad en modelos de animales que han recibido terapia vía ingesta controlada de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Lemire 1992, Cantorna 1996, Cantorna 1998, DeLuca 2001, Gregori 2002). Ha sido demostrado que el tratamiento de ratones diabéticos no-obesos (NOD) con análogos de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ reduce notoriamente la progresión de la insulinitis, y en consecuencia, inhibe el desarrollo de diabetes tipo 1 en dosis no-hipercalcemiantes (Mathieu 1994, Gregori 2002). También se ha demostrado que la deficiencia de vitamina D en el organismo inhibe la secreción de insulina por parte de las células pancreáticas (Frankel 1980) lo que del mismo modo se relacionaría con la prevención del desarrollo de DM1.

Por último, es importante destacar que se han llevado a cabo estudios poblacionales en humanos y los resultados indican que la suplementación de vitamina D durante la niñez

efectivamente puede prevenir el desarrollo de DM1 (The EURODIAB Substudy 2 Group 1999, Hyppönen 2001).

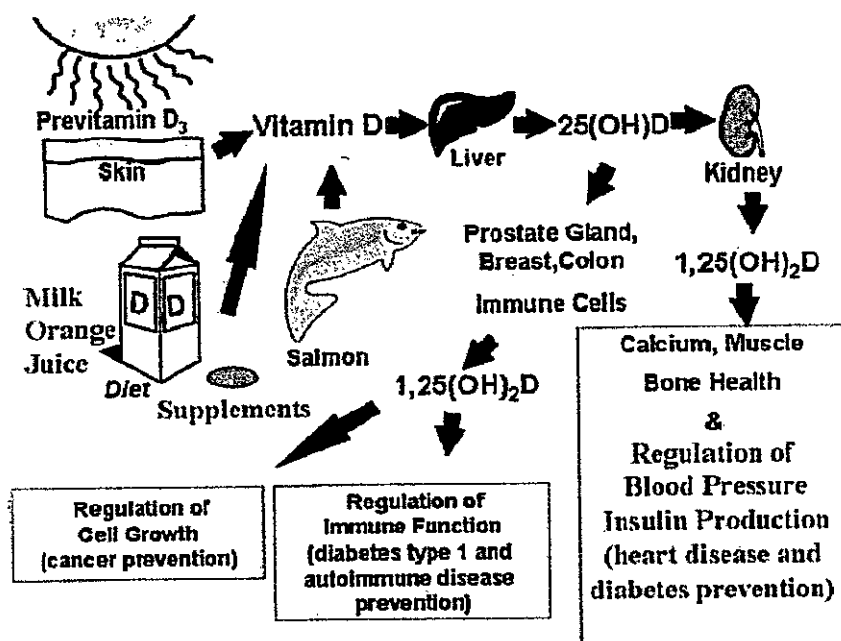


Figura 7. Representación esquemática de las acciones fisiológicas de la vitamina D respecto a salud cardiovascular, prevención de cáncer, regulación de la función inmune y disminución del riesgo a enfermedades autoinmunes. (Holick 2004)

7. Inmunología de la Acción de la Vitamina D

La presentación de autoantígenos específicos de células β por las APC (macrófagos o células dendríticas) a los linfocitos Th CD4⁺ en asociación con las moléculas MHC clase II es considerado el primer paso crítico en el inicio de la enfermedad. Los macrófagos secretan IL-12 lo que estimula a las células CD4⁺ a secretar IFN- γ e IL-2 (este último promueve la entrada de linfocitos T activados a la fase S). IFN- γ a su vez estimula a otros macrófagos para que liberen otras citoquinas como IL-1 β , TNF- α y radicales libres, tóxicos para las células β pancreáticas. Durante este proceso, se induce la migración linfocitos CD8⁺ citotóxicos específicos para los autoantígenos específicos de células β , que causan daño celular por medio de perforinas, granzimas y mediación de apoptosis por medio de Fas. Esta destrucción β celular luego termina en el inicio clínico de la DM1 (Kukreja 1999) (Figura 8).

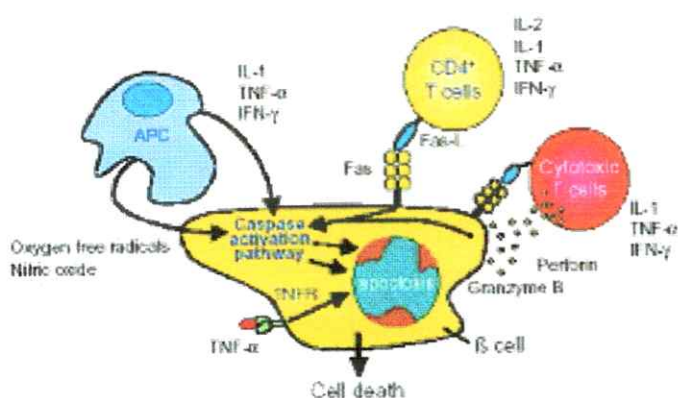


Figura 8. Mecanismo de destrucción β celular en DM1 (Kawasaki 2004)

Las células Th son diferenciables entre sí por su set de receptores de citoquinas que presentan y por las que secreta. Muchos estudios con modelos de ratón NOD y BB soportan el concepto de que la insulinitis destructiva de las células β se encuentra asociada con un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α) y citoquinas secretadas por Th1 (IFN- γ , TNF- β , IL-2 e IL-12), sin embargo la insulinitis benigna está asociada a expresión incrementada de citoquinas Th2 (IL-4 e IL10). Por esto se extrapola que el inicio de la respuesta autoinmune ligada al desarrollo de DM1 se encuentra asociada al estímulo del subset linfocitario Th1 y una baja de la respuesta Th2. Una de las formas de vislumbrar esto fue por medio de un estudio en el que se utilizaron ratones NOD con macrófagos depletados. Se advirtió una disminución de la actividad Th1 patogénica y un incremento en la respuesta Th2 inmunosupresora, todo debido a la falta del estímulo provocado por IL-12 que era antes secretada por los macrófagos. Esto expone una inclinación hacia una respuesta no-agresiva debido a la falta de un estímulo exógeno, lo que acaba en la subsistencia del stock de células β (Jun 1999).

La $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 *in vitro* inhibe la proliferación de células T específicas y eventualmente restringe la producción de las citoquinas IL-2 e IFN γ , típicas del perfil de secreción de linfocitos del subset Th1 (Lemire 2000), y además activa la expresión de IL-4 y de TGF- β (inhibe la proliferación y diferenciación de células T y B y antagoniza los efectos de IL-2, TNF- α e IFN- γ). También tiene efectos sobre IL-12 (que induce la secreción de IFN- γ por células T y NK, se comporta como factor de crecimiento y

mejora la actividad citolítica de estas) y sobre GMCSF (promotor de respuesta inmune que estimula la producción de macrófagos). Todo esto debido a la inhibición de la diferenciación del subset linfocitario Th1 y la generación de un aumento en la reactividad de los linfocitos T reguladores (DeLuca 1974, Lemire 1995, Suarez-Pinzón 2001). Complementariamente este metabolito participa en la diferenciación y maduración de células dendríticas críticas para la inducción de la respuesta inmune (Penna 2000). Toda esta evidencia explica los efectos benéficos de la vitamina D en contexto de las enfermedades autoinmunes, específicamente en el desarrollo de diabetes tipo 1.

Las distintas poblaciones donde se han realizado todos los estudios concernientes a los polimorfismos del VDR han demostrado la importancia tanto del "background" genético como la de factores relacionados a cada zona geográfica que alteran la aparición de la enfermedad. Al igual que lo que acontece al analizar HLA en los grupos de pacientes con DM1, los alelos de protección y susceptibilidad varían dentro de las distintas etnias, por lo tanto es importante considerar estas diferencias, lidiar con ellas y tratar de caracterizar lo más posible a las distintas poblaciones y a un mayor conjunto de determinantes genéticas para llegar a posibles tratamientos preventivos. Conjuntamente, los autoanticuerpos marcadores de enfermedad y los niveles de la vitamina D en el organismo constituirían armas importantes al momento de esta predicción. En la población Chilena no están caracterizados aún los efectos que podrían tener los polimorfismos del gen del VDR en grupos de diabéticos, menos se han determinado con certeza cuales sería posiblemente los genotipos o alelos relacionados tanto con

susceptibilidad y protección, y hace interesante la pronta instauración de líneas de investigación, incorporando por supuesto otros marcadores de riesgo ya conocidos que soporten esta posible predicción.

8. Hipótesis

Existe asociación entre polimorfismos del receptor de vitamina D (VDR), presencia de autoanticuerpos marcadores y niveles séricos de 25-hidroxivitamina D con una mayor susceptibilidad a desarrollar Diabetes Mellitus Tipo 1

9. Objetivos

9.1. Generales

- Realizar un estudio caso-control en una población de niños diabéticos de reciente diagnóstico y controles sanos de Santiago de Chile para analizar si existe asociación entre el polimorfismo del receptor y la presencia de enfermedad

9.2. Específicos

- Estimar la frecuencia de los genotipos de VDR para Bsm I, Apa I y Taq I en población diabética y controles
- Determinar niveles serológicos de autoanticuerpos marcadores de Diabetes Tipo 1 (IAA y anti-GAD65) y evaluar su asociación con el polimorfismo
- Determinar los niveles circulantes de vitamina D en niños recién diagnosticados y controles, y evaluar su asociación con los marcadores serológicos de respuesta autoinmune y con los polimorfismos del gen del receptor

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y Controles

Un total de 312 niños de Santiago de Chile fueron reclutados para la realización de este estudio entre Mayo del 2004 hasta Enero del 2005 desde distintos centros de atención hospitalaria (San Juan de Dios, San Borja Arriarán, Exequiel González Cortes). Este grupo comprendió a 119 diabéticos tipo 1 (68 niños y 51 niñas, $9,04 \pm 4,82$ edad de debut promedio (rango 0,1 – 24)) y a 193 controles sanos (100 niños y 93 niñas, $9,19 \pm 1,36$ edad promedio (rango 6 – 12)). El diagnóstico de DM1 fue realizado en base al criterio de la ADA (Silverstein 2005). Todos los pacientes y controles o sus padres dieron su consentimiento por escrito de ingreso al estudio. El presente trabajo fue aprobado por el comité de ética local (INTA, Universidad de Chile).

2. Extracción de DNA y Obtención de Genotipos

De cada paciente y control se obtuvieron aproximadamente 1 mL de sangre periférica. De cada muestra, el suero y los residuos sólidos fueron separados por centrifugación. Unos 500 μ l extraídos de suero fueron guardados para análisis posteriores y desde otros 500 μ l se obtuvo DNA genómico por medio de un protocolo de extracción utilizando solución de Chomczynski (Winkler, Santiago, Chile). Se obtuvieron los genotipos para los tres sitios de restricción polimórficos del gen VDR en estudio por medio de

amplificaciones del DNA de interés con PCR estándar y sets de primers específicos seguido de RFLP. Con este fin se utilizaron las enzimas de restricción Apa I, Bsm I y Taq I. Se llevó a cabo la reacción con dos diferentes sets de primers: primer sentido 5-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3 y primer antisentido 5-AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG-3 para Bsm I, y primer sentido 5-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA-3 y primer antisentido 5-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC-3 para Apa I y Taq I. Las condiciones de reacción para los tres polimorfismos fueron: 4 minutos de denaturación a 94°C y luego 30 ciclos, 94°C por 1 minuto, 60°C por un minuto y 72°C por un minuto. Terminando con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Al final de cada reacción se llevó a cabo un chequeo de amplificación en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio visualizado luego por exposición a luz ultravioleta. Las digestiones para Bsm I y Taq I fueron procedidas con 2U de enzima y 8 µl de los productos obtenidos de cada PCR por dos horas a 65°C, mientras que la digestión con Apa I fue realizada con una temperatura de restricción de 25°C. Los resultados de los RFLPs fueron visualizados en geles de agarosa al 2%. El producto de PCR para el polimorfismo Bsm I fue de 825 pb de largo, y cuando se encontró presente el sitio de corte se generaron dos fragmentos, uno de 650 pb y otro de 175 pb. Los productos de amplificación para Apa I y para Taq I fueron de 740 pb de largo. Cuando se encontró presente el sitio de corte Apa I se obtuvieron fragmentos de 530 y 210 pb. El sitio de restricción Taq I se encuentra presente dos veces en el amplificado, uno siempre presente que genera dos fragmentos, uno de 495 y otro de 245 pb (genotipo TT), y cuando se presentó el otro sitio en el amplificado se generaron dos fragmentos de 290 y 245 pb (genotipo tt) (Figura 9).

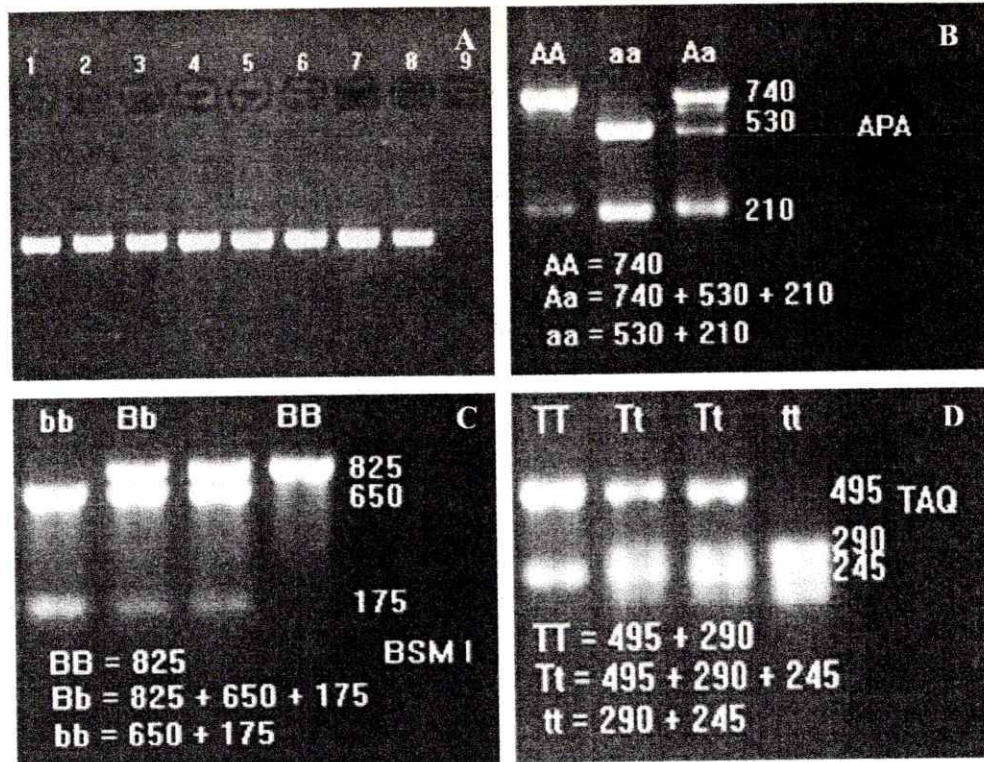


Figura 9. Patrones de amplificación y restricción. **A.** Chequeo de amplificación. **B.** Patrón de restricción para el polimorfismo Apa I. **C.** Patrón de restricción para el polimorfismo Bsm I. **D.** Patrón de restricción para el polimorfismo Taq I

3. Detección de Autoanticuerpos

La detección de la presencia serológica de anti-GAD₆₅, anti-IA2 e IAA fue realizada por medio de Radioinmunoensayos (¹²⁵I-RIA) de DRG diagnostic (Marburg, Germany). Para la detección de los autoanticuerpos IAA consideramos “muestras positivas” cuando el porcentaje de unión entre el anticuerpo y el trazador radioactivo fue mayor que el promedio mas 3 x SD de los valores obtenidos para el grupo control (en este caso, mayor que 5,812%) Para anti-GAD65 y anti-IA2 asignamos positivas a aquellas muestras que superaron concentraciones sobre 0.9 U/mL y 0.75 U/mL, respectivamente.

(3,22% y 12,28% CV intra e interensayo para anti-GAD respectivamente; 33,18% y 20,81% CV intra e interensayo para IAA respectivamente)..

4. Detección de Niveles Séricos de 25-Hidroxivitamina D

Las concentraciones séricas de 25-Hidroxivitamina D fueron determinadas por medio de un Radioinmunoensayo de DiaSorin (Stillwater, MN, USA). Este ensayo se encuentra bien caracterizado y reconoce efectivamente ambas formas de la vitamina (D₂ y D₃). Con este kit, se obtuvieron concentraciones séricas cuantificables de vitamina D en ng/mL. (11,58% y 11,07% CV intra e interensayo respectivamente).

5. Análisis Estadístico

Las diferencias en las frecuencias alélicas, genotípicas, de combinación de genotipos y el porcentaje de autoanticuerpos entre los pacientes con DM1 y el grupo control fueron analizados con pruebas χ^2 . Para las comparaciones entre ambos grupos en relación a los niveles de 1,25-(OH)₂D₃ se utilizó la prueba t student. Para estos análisis se utilizaron el programa Prime y el Simple Interactive Statistical Analysis (SISA; <http://home.clara.net/sisa/>). Para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó el programa Stata 8.2. Un p menor a 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

En una primera instancia se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para los tres polimorfismos en estudio de la totalidad de los casos y de los controles (Tablas 5, 6 y 7).

	Pacientes (n = 119)		Controles (n = 193)		p
	n	%	n	%	
Frecuencias Genotípicas					
TT	68	57,1	115	59,6	NS
Tt	38	31,9	66	34,2	NS
tt	13	10,9	12	6,2	NS
Frecuencias Alélicas					
Alelo T	87	73,1	148	76,7	NS
Alelo t	32	26,9	45	23,6	

Tabla 5. Distribución del polimorfismo Taq I en pacientes con DM1 y controles sanos

	Pacientes (n = 119)		Controles (n = 193)		p
	n	%	n	%	
Frecuencias Genotípicas					
AA	33	27,7	41	21,2	NS
Aa	63	52,9	103	53,4	NS
aa	23	19,3	49	25,4	NS
Frecuencias Alélicas					
Alelo A	64,5	54,2	92,5	47,9	NS
Alelo a	54,5	45,8	100,5	52,1	

Tabla 6. Distribución del polimorfismo Apa I en pacientes con DM1 y controles sanos

	Pacientes (n = 119)		Controles (n = 193)		p
	n	%	n	%	
Frecuencias Genotípicas					
BB	14	11,8	13	6,7	NS
Bb	53	44,5	71	36,8	NS
bb	52	43,7	109	56,5	0,0282
Frecuencias Alélicas					
Alelo B	40,5	34,0	48,8	25,1	NS
Alelo b	78,5	66,0	144,5	74,9	

Tabla 7. Distribución del polimorfismo Bsm I en pacientes con DM1 y controles sanos

Los resultados indican que en general no existen grandes diferencias en las distribuciones genotípicas y alélicas para los tres polimorfismos, exceptuando el genotipo bb que se manifestó significativamente de manera más frecuente en el grupo de controles comparado con los diabéticos (56,48% versus 43,70%, respectivamente; $p = 0,0282$) (Tabla 7 y Figura 10).

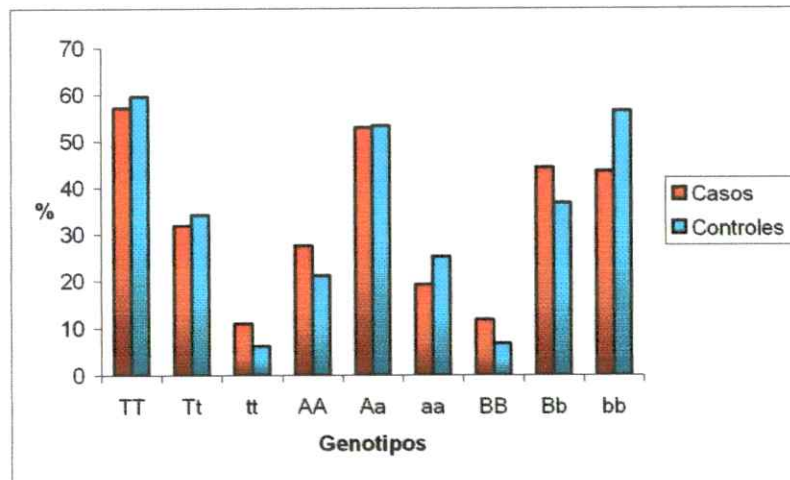


Figura 10. Distribución porcentual de casos y controles para cada uno de los genotipos simples

Tanto las frecuencias observadas en casos como en controles no varían significativamente de aquellas esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 8).

	Probabilidad Exacta de Significancia		
	Taq I	Apa I	Bsm I
Casos	0,0592	0,5797	1,0000
Controles	0,5471	0,3880	0,7060

Tabla 8. Equilibrio de Hardy-Weinberg.

2. Autoanticuerpos

En relación a los autoanticuerpos marcadores de autoinmunidad si se observaron grandes diferencias al comparar el grupo de personas diabéticas con el grupo de personas sanas (Tabla 9). Se advirtió una alta presencia de muestras positivas en los casos para ambos autoanticuerpos, en especial IAA⁺ (presente en el 53,78%). En contraste, de los sujetos sanos no se detectó a ninguno que manifestara positividad sérica para alguno de los dos.

Autoanticuerpos	Pacientes (n = 119)		Controles (n = 193)		P
	n	%	n	%	
Anti-GAD ⁺	50	42,0	0	0	0,0000*
IAA ⁺	64	53,8	0	0	0,0000*

Tabla 9. Prevalencia de los autoanticuerpos anti-GAD e IAA en pacientes con DM1 y controles

3. Vitamina D

Las concentraciones séricas de 25-hidroxivitamina D detectadas por los ensayos no presentaron diferencias significativas al comparar la totalidad de los casos y los controles (Tabla 10)

	Pacientes (n = 119)	Controles (n = 193)	P
25-(OH) D ₃ (ng/mL)	26,19 ± 9,67	26,64 ± 7,38	NS

Tabla 10. Concentración sérica de 25-Hidroxivitamina D en casos y controles

4. Genotipos Simples y Combinados más Frecuentes: Relación con Niveles de Autoanticuerpos y Vitamina D

Al analizar todos los genotipos simples señalados en las tablas 5, 6 y 7 respecto a las concentraciones de vitamina D se comprobó que para el grupo de estudio esta variable no presentó en ningún caso una diferencia estadísticamente significativa entre los casos y los controles (Tabla 11).

Niveles Séricos de 25-(OH) D3 (ng/mL)			
Genotipos	Casos	Controles	P
TT	24,3 ± 10,2	26,5 ± 7,4	NS
Tt	29,0 ± 8,3	27,0 ± 7,3	NS
Tt	28,0 ± 8,9	25,7 ± 8,0	NS
AA	25,0 ± 9,8	24,8 ± 7,6	NS
Aa	27,5 ± 9,9	27,7 ± 7,3	NS
Aa	24,1 ± 8,6	25,9 ± 7,1	NS
BB	26,8 ± 7,6	25,5 ± 7,7	NS
Bb	26,7 ± 10,1	26,8 ± 7,5	NS
bb	25,5 ± 9,8	26,6 ± 7,3	NS

Tabla 11. Concentración sérica de 25-Hidroxivitamina D en casos y controles en los genotipos simples

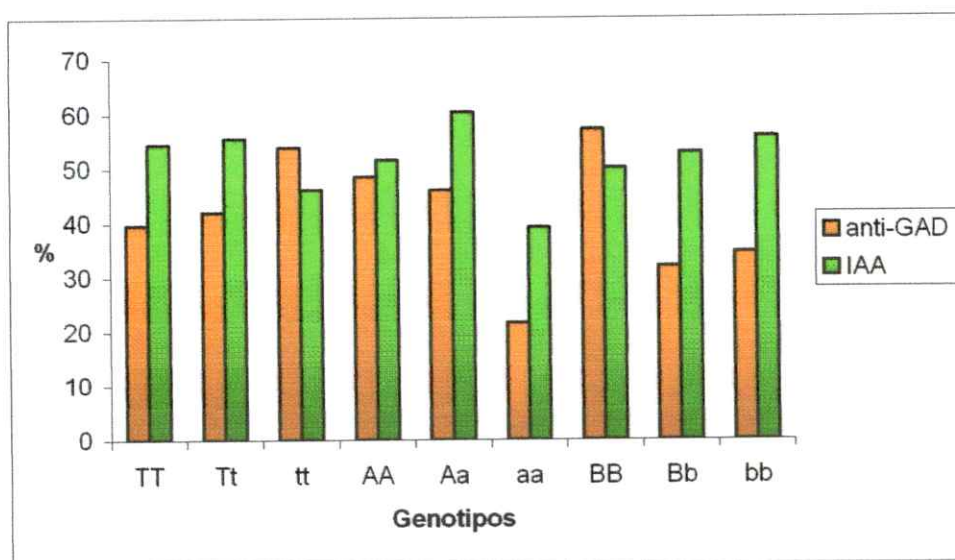


Figura 11. Distribución porcentual de los autoanticuerpos anti-GAD e IAA en cada uno de los genotipos simples de los casos con DM1

Sin embargo, si fueron posibles de observar en el grupo de pacientes DM1 importantes variaciones en los porcentajes de positividad de anti-GAD e IAA para cada uno de los genotipos expuestos en la Tabla 11. Sólo dos genotipos (tt y BB) presentaron mayor porcentaje de anti-GAD que de IAA (Figura 11).

Al analizar genotipos combinados del gen VDR se observó un patrón de similares características respecto a los genotipos simples en relación a los niveles séricos de la vitamina y de los autoanticuerpos (Tabla 12 y Figura 12). Por otra parte se logró identificar a cuatro genotipos específicos los cuales presentaron una tendencia de frecuencia, dentro de los cuales dos presentaron diferencias significativas importantes al momento de realizar el análisis caso-control (TTBb más frecuente en diabéticos, $p = 0,0014$; TTbb más frecuente en controles, $p = 0.0115$).

Genotipos	Distribución de Genotipos					Niveles Séricos de 25-(OH) D3 (ng/mL)		
	Casos		Controles		p	Casos	Controles	p
	n	%	n	%				
TTAA	12	10,1	10	5,2	0,1003	22,3 ± 11,5	23,7 ± 9,3	NS
TTBb	21	17,6	12	6,2	0,0014	21,7 ± 10,6	25,8 ± 7,5	NS
TTbb	46	38,6	103	53,4	0,0115	25,3 ± 10,0	26,6 ± 7,4	NS
aabb	18	15,1	45	23,3	0,08	24,4 ± 8,8	26,0 ± 7,4	NS

Tabla 12. Distribución de los genotipos dobles más frecuentes y niveles de concentración sérica de 25-Hidroxivitamina D en pacientes con DM1 y controles

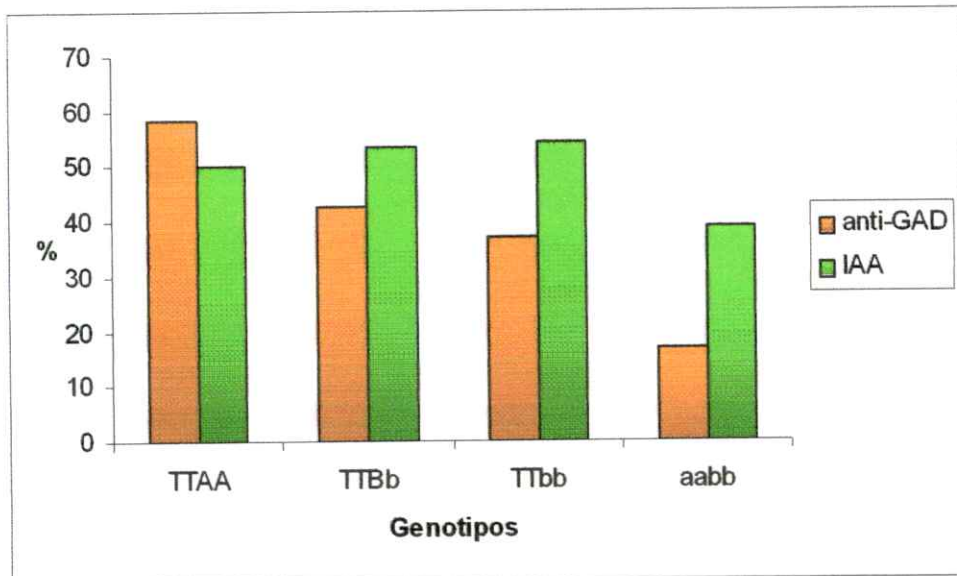


Figura 12. Distribución porcentual de los autoanticuerpos anti-GAD e IAA en genotipos dobles de los casos con DM1

En general los autoanticuerpos según lo expuesto por el gráfico siguen la relación de los casos totales al presentar más porcentaje de IAA que de anti-GAD, salvo lo observado para el genotipo TTAA.

Como último paso se compararon las distribuciones genotípicas, los niveles de vitamina y autoanticuerpos en genotipos combinados de los tres polimorfismos (Tabla 13). Los resultados indican que en general no existe una relación marcada de cualquiera de los dos grupos con un genotipo, salvo en dos casos: el genotipo aabbTT presenta una leve inclinación de frecuencia hacia los controles ($p = 0,0990$), y el genotipo AABbTT, hacia

los diabéticos ($p = 0,0056$). Este último caso coincide con una leve baja (aunque no significativa, $p = 0.1466$) en los niveles de vitamina D respecto a los controles.

Genotipos	Distribución de Genotipos				p	Niveles Séricos de 25-(OH) D3 (ng/mL)		P
	Casos (n = 105)		Controles (n = 182)			Casos	Controles	
	n	%	n	%				
AabbTT	25	21.1	52	26.9	NS	26,4 ± 11,2	28,0 ± 6,7	NS
aabbTT	18	15.1	44	22.8	0.0990	24,4 ± 8,8	25,9 ± 7,4	NS
AaBbTt	22	18.5	41	21.2	NS	30,9 ± 7,4	28,0 ± 7,8	NS
AABbTt	9	7.6	17	8.8	NS	25,9 ± 9,7	25,3 ± 6,8	NS
AABBtt	12	10.1	12	6.2	NS	26,8 ± 8,1	25,7 ± 8,0	NS
AaBbTT	8	6.7	7	3.6	NS	20,9 ± 9,5	26,0 ± 9,8	NS
AabbTT	3	2.5	7	3.6	NS	20,9 ± 5,9	20,6 ± 9,4	NS
AABbTT	8	6.7	2	1.0	0.0056	21,7 ± 13,6	29,9 ± 2,4	NS

Tabla 13. Distribución de los genotipos triples más frecuentes y niveles de concentración sérica de 25-Hidroxivitamina D en pacientes con DM1 y controles

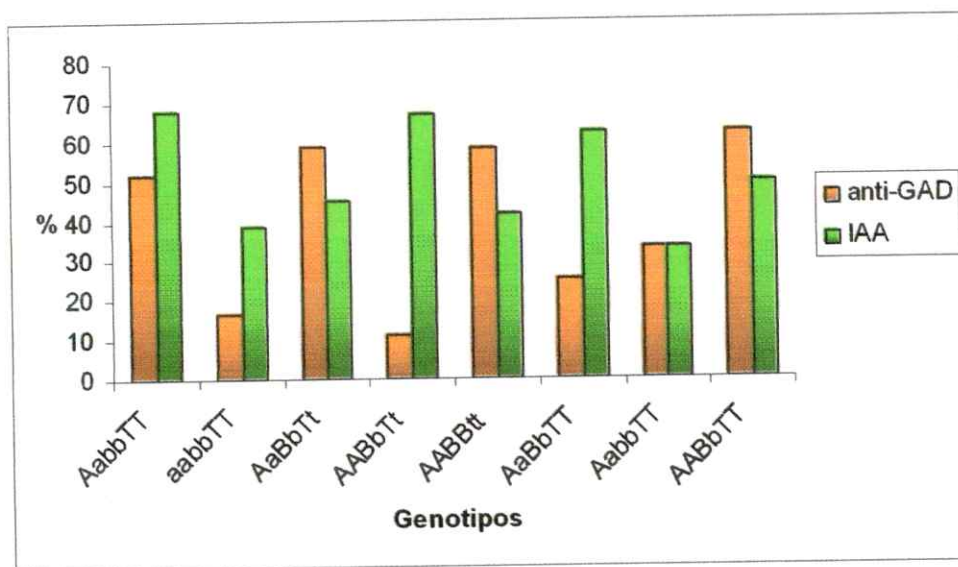


Figura 13. Distribución porcentual de los autoanticuerpos anti-GAD e IAA en los genotipos triples más frecuentes de los casos con DM1

El anticuerpo anti-GAD se presentó en mayor porcentaje en casos para los genotipos AaBbTt, AABBtt y AABbTT. Lo contrario ocurrió para el resto de los genotipos representados en la Tabla 13. (Figura 13)

5. Positividad de Autoanticuerpos y su Relación con Distribución Genotípica Específica y Niveles de Vitamina D

Para tratar de identificar con claridad si en los pacientes en estudio existían genotipos relacionados con niveles bajos o altos de los dos autoanticuerpos seleccionados, se compararon las frecuencias genotípicas dividiendo los casos en tres grupos:

- I. Uno que presentó muestras positivas para ambos anticuerpos
- II. Otro que presentó sólo uno de los dos anticuerpos

III. Un último grupo con muestras negativas para los dos (Figura 14)

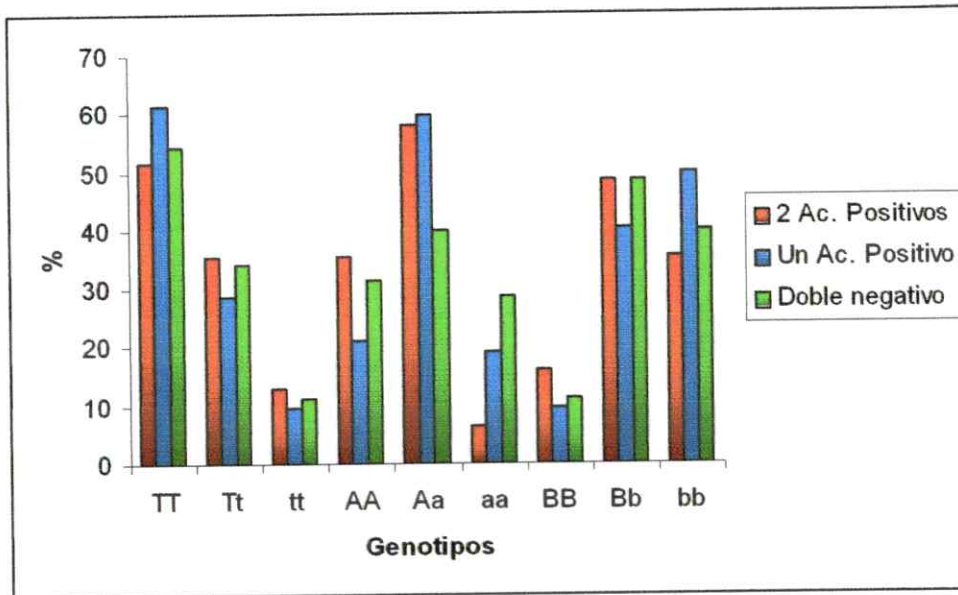


Figura 14. Distribución porcentual genotípica de los casos DM1 según presencia de los dos, cualquiera de los dos o ninguno de los autoanticuerpos

La figura 14 muestra que en general no existe una relación entre la presencia de ambos, cualquiera de los dos o ninguno de los autoanticuerpos y una mayor frecuencia de un genotipo específico en los casos con DM1.

De la misma manera, al analizar si los niveles séricos de vitamina D estaban relacionados con estos grupos de casos positivos para los dos, para uno o para ninguno de los anticuerpos, se observó que no existió ninguna diferencia significativa así como tampoco algún patrón característico entre la concentración sérica de esta hormona y estos grupos de casos establecidos (Tabla 14).

	Positivos para 2 Anticuerpos (anti-GAD e IAA) (n = 31)	Positivos para anti-GAD (n = 19)	Positivos para IAA (n = 33)	Dobles Negativos (n = 35)
Vitamina D (ng/mL)	29,14 ± 10,86	25,70 ± 7,90	23,95 ± 8,71	26,07 ± 10,12

Tabla 14. Niveles séricos de 25-Hidroxivitamina D según grupos de casos con presencia de los dos, de anti-GAD, de IAA o de ninguno de los autoanticuerpos

6. Relación entre Edad de Diagnóstico y Sexo con Distribución Genotípica, Niveles de Vitamina D y Presencia de Autoanticuerpos

Por otra parte al analizar el grupo de casos en base a la edad de diagnóstico de DM1, no se observaron grandes diferencias respecto a la distribución genotípica para cualquiera de los tres polimorfismos (Figura 15).

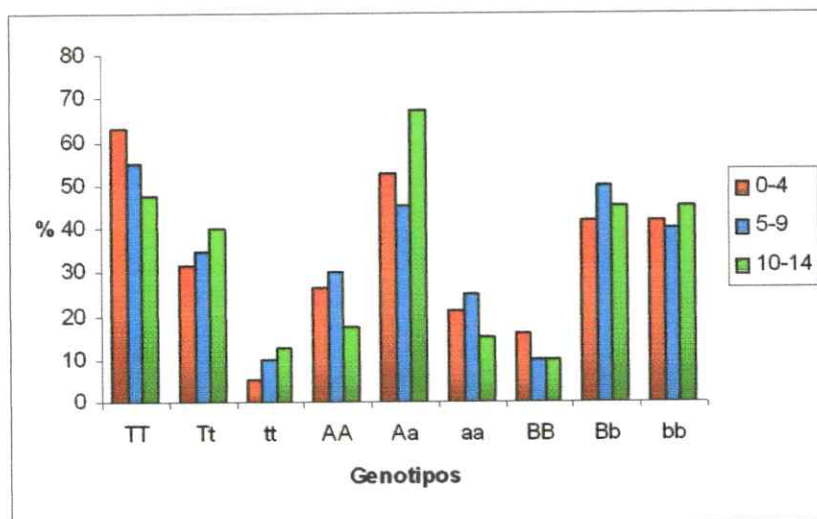


Figura 15. Distribución porcentual genotípica según grupo de edad en casos DM1

No obstante, si fue posible observar en la distribución de los dos autoanticuerpos marcadores en casos DM1 una diferencia respecto al porcentaje de IAA (Figura 16), el que presentó una baja notable en el grupo de los mayores de 10 años en relación al resto de los niños (68,42 % en el grupo de 0-4 años, 70 % en el grupo de 5-9, y en 37,5 % en el grupo de mayores de 10 años). Las mayores diferencias se registraron al comparar los grupos de 0-4 y 5-9 años de edad versus el grupo de mayor edad de los casos ($p = 0.05$ y $p = 0.036$, respectivamente).

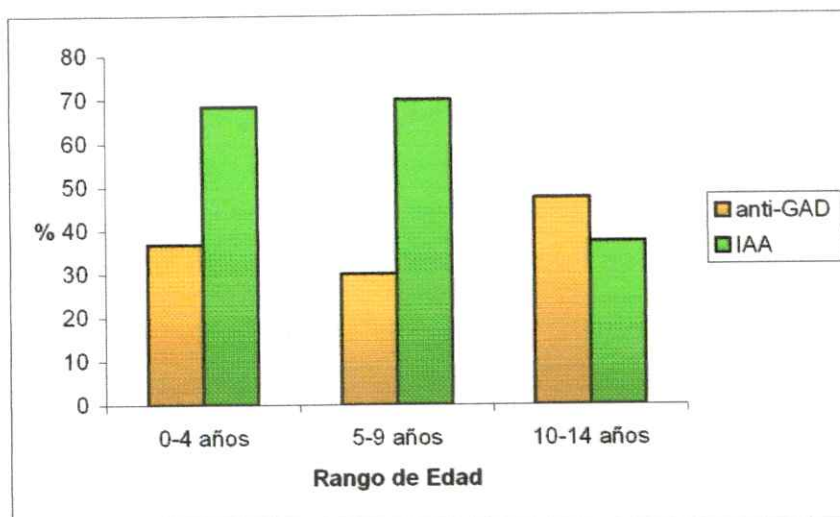


Figura 16. Distribución porcentual de los autoanticuerpos según grupo de edad en casos DM1

Respecto a la vitamina D, el grupo de mayor edad presentó una leve diferencia respecto a los otros dos grupos de menor edad. Se apreció una diferencia significativa entre el grupo de 0-4 años de edad versus el grupo de sobre 10 años ($p = 0.0337$) (Tabla 15).

	0-4 años	5-9 años	Sobre 10 años
Vitamina D (ng/mL)	23,92 ± 7,82	24,89 ± 10,89	29,02 ± 9,36

Tabla 15. Niveles séricos de 25-Hidroxivitamina D según grupo edad en casos DM1

Como últimos puntos a analizar, respecto al género no fueron detectadas diferencias entre las distribuciones genotípicas para los tres polimorfismos ni se revelaron diferencias significativas en los niveles séricos de vitamina D entre hombres y mujeres. Si fue posible observar una leve diferencia en el número de casos positivos de autoanticuerpos, específicamente los IAA, los que se detectaron en un mayor porcentaje en hombres respecto a las mujeres con DM1 (anti-GAD, 39,71 % hombres – 45,10 % mujeres, $p = 0,5553$; IAA, 58,82 % hombres – 47,02 % mujeres, $p = 0.0210^*$).

DISCUSIÓN

Las probables combinaciones alélicas de los genes involucrados en la etiología de la DM1 no son las mismas en los distintos grupos étnicos e incluso varían según las características de cada localidad (Buzzetti 1993). Aunque se de el caso de que los alelos implicados sean los mismos, la frecuencia en que estos se exhiben en cada población también varía considerablemente. Por esto, resulta importante determinar cuales son los alelos asociados a riesgo en cada población para hacer más viable el asesoramiento genético familiar.

1. Evidencia Bibliográfica

La asociación entre polimorfismos del gen VDR con la DM1 ya ha sido evaluada con anterioridad en otras poblaciones. Por ejemplo, se ha evidenciado transmisión preferencial del alelo "b" en descendencia afectada DM1 en 93 familias del sur de la India (McDermott 1997), y además se ha logrado demostrar una relación entre la secreción insulínica y el polimorfismo Apa I en población de Bangladesh ($p_c = 0,006$, estimándose una mayor secreción al genotipo AA, intermedia al Aa y la menor al aa) (Hitman 1998). También se ha confirmado asociación con estos marcadores génicos en población Taiwanesa, donde se observaron diferencias en estudios caso-control para las frecuencias alélicas de los polimorfismos Bsm I y Apa I, pero no para Taq I ($p = 0,015$; $p = 0,018$; $p = 0,266$, respectivamente). Los alelos B y A y los genotipos BB, Bb, AA y Aa se mostraron más recurrentes en los diabéticos que en los controles. Sin embargo,

tras la corrección estadística sólo Bsm I presentó variaciones alélicas significativas ($p_c = 0,045$) (Chang 1999).

Asimismo, en población alemana se han descrito desequilibrios de transmisión significativos para los haplotipos BsmI/ApaI/TaqI, BsmI/TaqI y ApaI/TaqI. Los alelos "At" y "Bt" fueron asignados a un mayor riesgo. En contraste, "AT" y "at" fueron ligados a protección. La combinación que aportó la mayor susceptibilidad correspondió al haplotipo "Bat" (transmitido en un 64%, $p = 0,0106$). Por su parte, el análisis del sitio Fok I no arrojó mayor información acerca de susceptibilidad y protección (Pani 2000). También en población Finlandesa, se han encontrado asociaciones con los alelos "B" y "F", e interesantemente se hallaron diferencias entre poblaciones de tres regiones distintas de Finlandia, no obstante, todas estas diferencias desaparecieron tras correcciones para pruebas estadísticas múltiples. Sólo se observó una tendencia de transmisión del alelo "F" (en 35,5 % de los hijos, $p = 0,005$) (Turpeinen 2003). Del mismo modo, en población española de Barcelona y Navarra se han analizado los genotipos Bsm I y Fok I observándose que las frecuencias alélicas y genotípicas para Bsm I presentan una tendencia hacia una mayor presencia del alelo "b" y del genotipo bb en el grupo con DM1 de Barcelona, al revés a lo observado en el grupo de Navarra. Paralelamente el análisis de Fok I presentó menor frecuencia de ff en los DM1 de Navarra respecto a sus contrapartes sanas ($p = 0,016$). El genotipo bb/FF se mostró más frecuente en los diabéticos de Barcelona ($p = 0,04$), mientras que bb/ff fue menos frecuente en la población diabética de Navarra ($p = 0,02$), en relación a sus respectivos controles. Por último, se constató que la distribución del haplotipo BF entre pacientes y

controles es inversa y significativamente diferente entre ambas ciudades ($p = 0,04$) (Martí 2004).

Otro estudio en población Húngara de Budapest analizó además de los cuatro genotipos ya descritos, un quinto señalado como Tru91 (alelo "u"). Este estudio no mostró ninguna diferencia en el diseño caso-control para ninguno de los 5 genotipos estudiados, sin embargo, se vislumbró una leve asociación cuando se analizaron simultáneamente los alelos "b", "a" y "u" sólo en niñas, estimándose una significativa mayor prevalencia en este grupo DM1 en comparación a los controles ($p = 0,005$) (Gyorffy 2002).

Estudios realizados en Japón, han establecido una mayor prevalencia del alelo "F" (genotipo FF) del polimorfismo Fok I en casos DM1 (44% de los pacientes) versus una población de individuos sanos (33% de los controles) (Ban 2001). Por otra parte, otro grupo de investigadores, también en Japoneses, detectaron en un estudio que abarcó a 108 diabéticos y 120 controles, que los genotipos FF y tt eran más frecuentes y que el genotipo aa era menos frecuente en los casos que en los controles, pero ninguna de estas diferencias alcanzó significancia estadística (Yokota 2002). En un tercer estudio de tipo caso-control otra vez en población japonesa, detectó una mayor frecuencia del alelo B en diabéticos ($p = 0,0010$), donde también se hizo una distinción entre individuos diabéticos con debut agudo de la enfermedad y otro grupo de diabéticos con debut moderado (el primer grupo presentaba destrucción β celular, como causa primaria de debut, tendencia hacia cetoacidosis y un período transcurrido entre el debut y el inicio del tratamiento con insulina menor a 6 meses; mientras que el segundo sólo presentaba

positividad de autoanticuerpos y un período entre debut y tratamiento insulínico mayor a 12 meses). Se constató una diferencia significativa entre los diabéticos de debut agudo y controles ($p = 0,0002$), lo que no se observó al comparar el grupo de diabéticos de debut moderado versus controles (Motohashi 2003).

Se han vislumbrado también diferencias entre grupos étnicos importantes en la frecuencia de estos polimorfismos, como por ejemplo análisis para Bsm I, Apa I y Taq I que han revelado que el genotipo BBAAtt es relativamente común en la población caucásica (16,7%), pero raro en población Japonesa (1,4 %) (Tokita 1996).

Por último, en el único estudio de asociación familiar conducido en Chile hasta la fecha respecto a VDR y DM1 (que abarcó a 59 tríos casos-padres), se observó que no existió una transmisión alélica preferencial significativa respecto a los polimorfismos Apa I, Taq I y Bsm I del gen del VDR, ni tampoco se detectó alguna asociación al realizar un análisis de haplotipos (Ángel 2004).

Finalmente, un estudio multinacional (Finlandia, Noruega, Rumania, Estados Unidos) indicó en sus resultados que las variaciones comunes en la secuencia del gen del VDR no tendrían un mayor efecto en la DM1 (Nejentsev 2004).

2. Distribución Genotípica en Nuestro Grupo de Estudio

La presente investigación sólo dejó ver una diferencia significativa para un único genotipo (bb) que se manifestó de manera más frecuente en controles en comparación a los diabéticos tipo 1. Es interesante el hecho de que esta especial distribución sólo haya sido detectada previamente por un único estudio en una población originaria de Navarra (España) (Martí 2004) y que es también diametralmente opuesta a la registrada en otras poblaciones, como por ejemplo, la de origen hindú (McDermott 1997). Al realizar combinaciones genotípicas entre los tres polimorfismos, además del genotipo bb, se observaron otras importantes diferencias, como la presencia más frecuente del genotipo TTbb en diabéticos y del genotipo TTBB en controles. Por supuesto, la última de estas diferencias se encuentra influenciada única y exclusivamente por el alelo b. Cabe destacar, que las diferencias respecto a estos genotipos en nuestros casos y controles no se encuentran ampliamente referenciadas en la literatura.

Para los genotipos triples sólo se observó una leve tendencia de mayor frecuencia hacia los controles para el genotipo aabbTT y para el genotipo AABbTT en los diabéticos. La primera no alcanzó significancia estadística, por lo tanto el genotipo no podría ser considerado como un posible factor de susceptibilidad. El segundo genotipo, que si bien presenta una diferencia estadísticamente significativa para su distribución ($p = 0.005$), probablemente requiera de un mayor tamaño muestral que confirme esta tendencia.

En resumen, la distribución genotípica preferencial de los tres polimorfismos VDR en la población estudiada, presenta una similitud marginal con la distribución descrita en la localidad española de Navarra (Martí 2004). Probablemente, las variaciones observadas en el grupo analizado pueden haberse visto afectadas directamente por la composición genética particular de la población chilena nativa, o quizás debido a un evento de estratificación poblacional, lo que eventualmente puede haber hecho variar la concordancia con otros estudios publicados.

Por último, cabe destacar que no existieron variaciones de los genotipos simples para cada polimorfismo según sexo y edad de debut, lo que también es consistente con la bibliografía (Motohashi 2003).

3. Marcadores de Autoinmunidad

Desde el punto de vista inmunológico, nuestro trabajo es concordante con una amplia serie de estudios que relacionan los mayores títulos de los autoanticuerpos estudiados con el desarrollo de Diabetes Tipo 1 (Serrano-Ríos 1996, Pérez-Bravo 2001, Falorni 2005). A pesar de que los resultados obtenidos no están dentro del rango de porcentajes esperados para el grupo de diabéticos: 80 – 90 % para anti-GAD, 30 – 40 % para IAA en la literatura (50 % para anti-GAD, 64 % para IAA en el presente estudio) cumplen las expectativas a cabalidad de marcadores de autoinmunidad ya que el grupo control no presentó ningún título positivo (Tabla 9).

También, nuestras observaciones prueban que estos anticuerpos se distribuyen en forma diferencial entre los diabéticos según edad y sexo. Las tendencias observadas de mayor porcentaje de IAA en los hombres diabéticos y de una baja del mismo en el grupo de mayor edad de los casos (sobre 10 años) se encuentran bien descritas por trabajos anteriores (Bilbao 2000, Krochik 2001, Borg 2002, Williams 2003). El mayor porcentaje de anti-GAD presente en las mujeres diabéticas respecto a los hombres (aunque no representó una diferencia significativa) también se encuentra señalado con anterioridad por otros grupos de investigadores, pero su leve baja respecto a la edad es contraria a lo anteriormente descrito (Bilbao 2000, Krochik 2001). Se sugiere que el nivel de agresividad para la pérdida de masa y función β celular es mayor en niños más jóvenes y en aquellos de inicio temprano. Esto concuerda con los niveles serológicos aumentados de IAA observados en esta etapa, lo que podría reflejar que las reacciones autoinmunes primarias ligadas a la DM1 estarían de alguna forma determinadas por una acción humoral sobre la misma insulina.

4. Niveles Séricos de Vitamina D

Los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D detectados en este estudio fueron consistentes a lo sugerido por investigaciones anteriores (Rodríguez 2001, Leiva 2003). En la literatura, se ha demostrado dos fenómenos: 1) que los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D disminuyen en individuos con Diabetes Tipo 1 respecto a grupos de individuos sanos (Baumgartl 2001, Scragg 2004), 2) que no existen diferencias entre casos y controles (Hitman 1998) (estudios realizados en distintas poblaciones). Esto

último concuerda con lo descrito para nuestro estudio, donde no se observaron tampoco diferencias significativas entre ambos grupos. Esto puede reflejar que en general los individuos incluidos en este estudio presentan baja sensibilidad a la vitamina D.

A pesar de esto último, nuestros datos sugieren sutiles diferencias entre los niveles de vitamina D al comparar los casos y controles, tal vez no globalmente, pero si en el caso de genotipos específicos. De este modo, se observaron diferencias en los niveles séricos de vitamina D, que a pesar de no alcanzar una significancia estadística, son claramente más bajos en los diabéticos que en los controles, como es el caso particular de los genotipos AaBbTT y AABbTT ($20,90 \pm 9,53$ ng/mL vs. $26,05 \pm 9,78$ ng/mL para el primero; $21,74 \pm 13,64$ vs. $29,95 \pm 2,40$ ng/mL para el segundo). Llama la atención que el genotipo AABbTT presenta además de una diferencia significativa respecto a las distribuciones genotípicas entre los dos grupos de estudio, una disminución en los niveles séricos de vitamina D observada en los diabéticos. Sin embargo, como ya se discutió anteriormente, el número muestral analizado para este genotipo específico es muy bajo para poder asegurar el verdadero impacto de este genotipo.

Respecto a los niveles de vitamina D, según edad y sexo, sólo para la variable edad los niveles de vitamina D se incrementaron significativamente a medida que el grupo analizado aumentó su rango de edad, lo que concuerda con lo descrito previamente (Scragg 1995). Estos resultados sugieren que a pesar de que en el total de casos y controles incluidos en el estudio los niveles de vitamina D se mantuvieron constantes, la sensibilidad a esta hormona se encontraría ligada exclusivamente a inicio de la

sintomatología a temprana edad y consecuentemente al nivel de agresividad de la destrucción β pancreática. Lo anterior, es concordante según la literatura mencionada en la introducción respecto a los niveles bajos de vitamina D en niños que desarrollan la enfermedad tempranamente. Este evento estaría relacionado con un ataque más agresivo y fulminante debido a que aún no presentan una barrera defensiva bien establecida contra estímulos externos, lo que se puede manifestar por una acción directa de un agente patógeno sobre las células productoras de insulina o por la acción propia del organismo debido a un efecto de mimetismo molecular. La vitamina D cumpliría entonces, en cierto nivel, con proporcionar una barrera defensiva ligada al bloqueo de la vía apoptótica que lleva a la destrucción de las células β .

5. Polimorfismos, Inmunidad y Vitamina D

Por otra parte, nuestro estudio no demostró una asociación clara entre un determinado polimorfismo (genotipos del gen VDR) y un patrón especial de autoinmunidad en la población diabética que fue analizada, lo que es consistente con lo previamente descrito en la literatura (Chang 2000). Sólo se observó algunos genotipos simples que presentaron una leve tendencia en los controles hacia un mayor porcentaje de positividad para IAA que para anti-GAD, salvo para el genotipo Bb que exhibió todo lo contrario (Figuras 10 y 11). En los genotipos dobles no se observó relación alguna entre una distribución especial de aquellos que fueron considerados más relevantes, con respecto a una tendencia particular de uno u otro autoanticuerpo. Para los genotipos

triples tampoco esta teórica relación se cumplió, puesto que los genotipos AaBbTt y AaBbTT escapan del posible patrón propuesto (se presentan con mayor frecuencia en controles y anti-GAD en el primer caso, y mayor frecuencia en casos e IAA en el segundo).

Tampoco del análisis de grupos dobles positivos, un positivo y negativos para los autoanticuerpos estudiados en relación a los polimorfismos se pudo observar alguna característica especial de distribución (Figura 14). Toda esta evidencia sugiere que las características serológicas de autoinmunidad no se encuentran determinadas desde un principio por la presencia o no de alguno de estos genotipos estudiados (Chang 2000). Estos factores de autoinmunidad podrían estar más ligados a susceptibilidad adquirida por algún otro efecto del medio o ligado más consistentemente a otro factor genético de mayor potencia predictiva.

No existió tampoco una relación proporcional entre los niveles séricos de la hormona y la presencia de autoanticuerpos marcadores, lo que se observó del análisis de estos niveles en grupos de pacientes que presentaron positividad para ambos, para cada uno y para ningún anticuerpo (Tabla 14). Cabe destacar que en la literatura no existe ningún estudio que relacione estas dos variables.

Como existiría esta baja en la sensibilidad respecto a las propiedades de la vitamina D en la población en estudio, sus niveles no reflejarían directamente el status de los

eventos autoinmunes, pues según estos datos no se encontrarían ligados con positividad para alguno de los dos autoanticuerpos seleccionados.

6. Comentarios Finales

La vitamina D entonces cumple en este estudio, aunque de manera marginal, con lo estipulado según lo revisado en la bibliografía. Sus funciones podrían estar efectivamente ligadas a una baja de la respuesta Th1 (exclusivamente en la fase temprana del desarrollo de la enfermedad), es decir, los linfocitos Th1 no se estimularían para secretar citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12), sustancias tóxicas (granzima B o perforina), o provocar la destrucción de las células β mediante la vía Fas, ya que la activación y expansión clonal de estos se encontrarían inhibidas bajo la acción inmunoreguladora del perfil de citoquinas del subset de linfocitos Th2.

En relación a los polimorfismos del gen del VDR, los resultados indicaron a algunos genotipos que podrían considerarse como factores de susceptibilidad y que podrían servir como un apoyo predictivo para aquellos que ya se encuentran más establecidos (HLA, CTLA-4, INS). Sin embargo, la relación entre estos y la presencia de la enfermedad no se aclara completamente a la luz de estos resultados. Aparentemente, estos polimorfismos se encontrarían en las cercanías de un posible gen u otros polimorfismos que realmente estén ligados a susceptibilidad para el desarrollo de la

DM1. De esta forma también se puede sugerir que estos polimorfismos no tendrían una acción directa en las funciones ejercidas por la hormona y que tampoco se encontrarían ligados a un patrón de autoinmunidad, al contrario de lo observado entre los niveles de vitamina D y el perfil del autoanticuerpo IAA.

La información detallada acerca de estos u otros genes que se encuentren regulados e involucrados en la muerte β celular abren paso para nuevas investigaciones que aborden el tema desde distintos ángulos. La consideración de diversos genes marcadores, permitiría elaborar un cuadro más completo de la etiología de esta enfermedad y consecuentemente llegar a detectar con mayor seguridad el momento en que un individuo empieza a evidenciar daño β celular precoz. Todo lo anterior permitiría establecer medidas de riesgo cuyo objetivo final sea adelantarse al inicio clínico de la enfermedad y poder establecer medidas preventivas.

CONCLUSIONES

El análisis de los datos nos permitió determinar si existió o no una relación entre polimorfismos del gen del VDR y el desarrollo de la DM1. Así, fue posible establecer que:

- a) La frecuencia de un genotipo (bb) del polimorfismo Bsm I fue significativamente mayor en controles que en diabéticos;
- b) Al combinar genotipos se observó que las frecuencias de TTbb y aabbTT fueron mayores en los controles y que las frecuencias de los genotipos TTbb y AABbTT fueron mayores en los diabéticos;
- c) Los dos autoanticuerpos marcadores elegidos se encuentran relacionados positivamente con la presencia de DM1;
- d) Existe una relación entre menores títulos de IAA y aumento de la edad de los diabéticos tipo 1;
- e) Los niveles serológicos detectados de vitamina D en el estudio en general no presentaron diferencias significativas entre casos y controles, sólo en el caso de algunos genotipos aislados (AABbTT y aabbTT) y en grupos de diabéticos de menor edad se observaron bajas en estas concentraciones séricas.

Los resultados de este estudio podrían sugerir que ciertos genotipos del VDR podrían ser considerados como marcadores de susceptibilidad y protección, como apoyo a otros ya conocidos, también que los autoanticuerpos marcadores son válidos como elementos

predictivos (sobre todo IAA que se manifiesta de manera más temprana), y que a pesar de que no se observaron diferencias entre los niveles de vitamina D entre casos y controles, la baja de estos en diabéticos de debut más temprano sugiere que probablemente esta hormona estaría cumpliendo en cierto nivel con sus roles inmunosupresores en nuestra población.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. 1986. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol.* 13: 899-902.
2. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakana M, Tuohimaa P. 2000. Prostate cancer risk and pre-diagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control.* 11: 847-852.
3. Åkerblom HK, Vaarala O, Hyöty H, Ilonen J, Knip M. 2002. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet. (Semin Med Genet)* 115: 18-29.
4. Ángel B, Santos JL, Carrasco E, Albala C, Pérez-Bravo F. 2004. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in Chilean subjects: a case-parent study. *Eur J Epidemiol.* 19 (12):1085-1087.
5. Arslanian S, Becker D, Rabin B, et al. 1985. Correlates of insulin antibodies in newly diagnosed children with insulin-dependent before insulin therapy. *Diabetes.* 34: 926-931.
6. Atkinson MA, Maclaren NK. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 331: 1428-1436.
7. Bækkeskov S, Nielsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark Å. 1982. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature.* 298: 167-169.
8. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW. 1988. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 3294-3298.
9. Ban Y, Taniyama M, Yanagawa T, et al. 2001. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism influences genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Japanese population. *BMC Med Genet.* 2: 7.
10. Bar-Shavit Z, Teitelbaum SL, Reitsma P, Hall A, Pegg LE, Trial J, Kahn AJ. 1983. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 5907-5911.
11. Baumgartl HJ, Standl E, Schmidt-Gayk H, Kolb HJ, Janka HU, Ziegler AG. 1991. Changes of vitamin D₃ serum concentrations at the onset of immune-mediated type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 16 (3): 145-148.

12. Bell GI, Horita S, Karam JH. 1984. A polymorphic marker near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 33: 176-183.
13. Betterle C, Presotto F, Pedini B, et al. 1987. Islet cell and insulin autoantibodies in organ specific autoimmune patients. Their behavior and predictive value for the development of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus, a 10 years follow up study. *Diabetologia*. 30: 292-298.
14. Bilbao JR, Rica I, Vazquez JA, Busturia MA, Castano L. 2000. Influence of sex and age at onset on autoantibodies against insulin, GAD65 and IA2 in recent onset type 1 diabetic patients. *Horm Res*. 54 (4): 181-185.
15. Bingley PJ, Douek I, Rogers CA, Gale EAM. 2000. Influence of maternal age at delivery and birth order on risk of type 1 diabetes in childhood: prospective population based family study. *BMJ*. 321 420-424.
16. Borg H, Marcus C, Sjoblad S, Fernlund P, Sundkvist G. 2002. Insulin autoantibodies are of less value compared with islet antibodies in the clinical diagnosis of autoimmune type 1 diabetes in children older than 3 yr of age. *Pediatric Diabetes*. 3 (3): 149-154.
17. Bruining CJ. 2000. Association between infant growth before onset of juvenile type-1 diabetes and autoantibodies to IA-2. Netherlands Kolibríe study group of childhood diabetes. *Lancet*. 356: 655-656.
18. Buzzetti R, Nistico L, Osborn JF, Giovannini C, Chersi A, Sorrentino R. 1993. HLA-DQA1 α 1 and DQB1 gene polymorphism in type-I diabetic patient from central Italy and their use for risk prediction. *Diabetes*. 42(8): 1173-8.
19. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 7861-7864.
20. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1998. 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr*. 128: 68-72.
21. Carling T, Ridefelt P, Hellman P, Rastad J, Akerstrom G. 1997. Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 82: 1772-1775.
22. Carrasco E, Pérez-Bravo F, Dorman J, Mondragón A, Santos JL. 2005. Increasing incidence of type 1 diabetes in population from Santiago of Chile: trends in a period of 18 years (1986 -2003). *Diab Metab Res Rev*. Early view.

23. Cavallo MG, Fava D, Monetini L, Barone F, Pozilli P. 1996. Cell-mediated immune response to β casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet*. 348: 926-928.
24. Chang TJ, Lei HH, Yeh JJ, et al. 2000. Vitamin D receptor gene polymorphism influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol*. 52: 575-580.
25. Christiakos S, Raval-Pandya M, Wernyj RP, Yang W. 1996. Genomic mechanism involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Biochem*. 316: 361-371.
26. Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA. 1998. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 10529-10534.
27. Cruz-Coke R. 1976. Origen y evolucion étnica de la población Chilena. *Rev Med Chil*. 104: 365-368.
28. Dahlquist G, Källén B. 1992. Maternal-child blood group incompatibility and other perinatal events increase the risk for early onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 35: 671-675.
29. DeLuca, H. 1974. Vitamin D: the vitamin and the hormone. *Federation Proc*. 33: 2211-2219.
30. DeLuca HF, Cantorna MT. 2001. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J*. 15: 2579-2585.
31. Dorman JS, McCarthy B, McCanlies E, et al. 1996. Molecular IDDM epidemiology: international studies. *Diab Res Clin Pract*. 34: S107-S116.
32. Dosch H, Cheung R, Karges W, Pietropaolo M, Becker D. 1999. Persistent T cell anergy in human type I diabetes. *J Immunol*. 163: 6933-40.
33. Ebers GC, Sadovnick AD. 1994. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol*. 54: 1-17.
34. Elliot RB, Martín JM. 1984. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat?. *Diabetologia*. 26: 297-299.
35. Falorni A, Brozzetti A. 2005. Diabetes-related antibodies in adult diabetic patients. *J Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 19 (1): 119-133.

36. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, et al. 1986. The histopathology of the pancreas in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25 years review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia*. 29: 267-277.
37. Frankel BJ, Heldt AM, Gordsky GM. 1980. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science*. 209: 823-825.
38. Gamble DR, Kinsley ML, Fitzgerald MG, Taylor KW. 1969. Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J*. 3: 627-630.
39. Garland CF, Garland FC, Shaw EK, Comstock GW, Helsing KJ, Gorham ED. 1989. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet*. 1: 1176-1178.
40. Gepts W. 1965. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 14: 619-623.
41. Gepts W, De Mey J. 1978. Islet cell survival determined by morphology: an immunocytochemical study of the islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 27 (Suppl 1): 251-255.
42. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. 2002. A $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ analog enhances regulatory t-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 51: 1367-1374.
43. Gyorffy B, Vasarhelyi B, Krikovszky D, et al. 2002. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 147: 803-808.
44. Haussler, MR, Norman, AW. 1969. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 62 (1):155-62.
45. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. 1998. The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Min Res*. 13; 325-349
46. Hawa MI, Beyan H, Buckley LR, Graham RD. 2002. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. *Am J Med Genet (Semin Med Genet)*. 115: 8-17.
47. Hirschhorn JN. 2003. Genetic epidemiology of type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*. 4: 87-100.
48. Hitman GA, Tarn AC, Winter RM, et al. 1985. Type 1 (insulin-dependent) diabetes and a highly variable locus close to the insulin gene on chromosome 11. *Diabetologia*. 28: 218-222.

49. Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, Aganna E, Ogunkolade BW, Hales CN, Boucher BJ. 1998. Vitamin D receptor gene polymorphism influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes*. 47: 688-690.
50. Holick MF. 1998. Clinical efficacy of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogues in the treatment of psoriasis. *Retinoids*. 14: 12-17.
51. Holick MF. 2002. Vitamin D. The underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 9: 87-89.
52. Holick F. 2004. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. 79: 362-371.
53. Horst RL, Reinhardt TA. 1997. Vitamin D metabolism. In: Fieldman D, Glorieux, FH, Pike JW, eds. *Vitamin D*. San Diego: Academic Press; 13-32.
54. Hua LJ, Palumbo PJ, Chu, CP. 1994. Incidence of diabetes mellitus by clinical type. *Diabetes Care*. 17: 1206-1208.
55. Hyppönen E, Kenward MG, Virtanen SM, Piitulainen A, Virta-Autio P, Tuomilehto J, Knip M, Åkerblom HK, the Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. 1999. Infant feeding, early weight gain, and risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 22: 1961-1965.
56. Hyppönen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. 2001. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 358: 1500-1503.
57. Ilonen J, Reijonen H, Herva E. 1996. Rapid HLA-DQB1 genotyping for four alleles in the assessment of risk for IDDM in the Finnish population. The Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care*. 19: 795-800.
58. Jauser AM, Van Hagen M, Drexhage HA. 1995. Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type I diabetes. *Lancet*. 345: 491-492.
59. Jones DB, Armstrong NW, Coxsackie virus and diabetes revisited. 1995. *Nat Med*. 1: 284.
60. Jones G, Strugnell S, DeLuca H. 1998. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews*. 78: 1193-1231.
61. Jun HS, Yoon CS, Zbytnik L, van Rooijen N, Yoon, JW. 1999. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 189: 347-358.

62. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, Stengard J, Kesaniemi YA. 1992. Concordance for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*. 35: 1060-1067.
63. Karjalainen J, Martin JM, Knip M, et al. 1992. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med*. 327: 302-307.
64. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. for the WHO DIAMOND project group. 1993. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 36: 883-892.
65. Kato S. 2000. The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J Biochem*. 127: 717-722.
66. Kaufman DL, Erlander HG, Clare-Salzer M, et al. 1992. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 89: 283-289.
67. Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K. 2004. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of β cell damage. *Diab Res Clin Pract*. 66: S27-S32.
68. Khalil I, D'Auriol L, Gobet M, et al. 1990. A combination of HLA-DQB Asp 57 negative and HLA-DQA Arg 52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 85: 1315-1319.
69. King ML, Bidwell D, Shaikh A, et al. 1983. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. i: 1397-1399
70. Kohama K, Uemasu J, Kawasaki H, Nanba E, Tokumoto A. 2000. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and renal osteodystrophy in patients on maintenance hemodialysis. *Yonago Acta Medica*. 43: 27-38.
71. Krochik AG, Mazza CS, Valdez SN, Stumpo RR, Papouchado ML, Iacono RF, Cardoso Landaburu AC, Sica MP, Ozuna B, Poskus E. 2001. Immunologic and genetic markers in insulin-dependent diabetes mellitus (type 1) in an Argentine population. *Medicina (B Aires)*. 61 (3):279-283.
72. Kukreja A, Maclaren N. 1999. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 84: 4371-4378.
73. LaPorte ER, Matsushima M, Chang YF. 1995. Prevalence and incidence of insulin-dependent diabetes. *Diabetes in America*. 2nd edition: 37-46.

74. Larenas G, Montecinos M, Manosalva M, Barthou M, Vidal T. 1996. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in the IX region of Chile: ethnic differences. *Diab Res Clin Pract.* 34: S147-S151.
75. Leiva L, Burrows R, Burgueño M, Ríos G, Bergenfreid C, Chavez E, Muzzo S. 2003. Calcium intake and vitamin D plasmatic levels in celiac children: risk factors for their future life. *Rev Chil Nutr.* 30 (3): 250-254.
76. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1992. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity.* 12: 143-148.
77. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spielberg HL. 1995. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr.* 125: 1704S.
78. Lemire J. 2000. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ – a hormone with immunomodulatory properties. *Z Rheumatol.* 59: 24-27.
79. Leslie RDG, Atkinson MA, Notkins AL. 1999. Autoantigens IA-2 and GAD in type 1 (insulin dependent) diabetes. *Diabetologia.* 42: 3-14.
80. MacLaughlin J, Gange W, Taylor D, Smith E, Holick M. 1985. Cultured psoriatic fibroblast from involved and uninvolved sites have partial, but not absolute resistance to the proliferation-inhibition activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci.* 52: 5409-5412.
81. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 83: 835-839.
82. Manolagas SC, Provvedini DM, Tsoukas CD. 1985. Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and the immune system. *Mol Cell Endocrinol.* 43: 113-122.
83. Marcus R. Agents affecting calcification and bone turnover: calcium, phosphate, parathyroid hormone, vitamin D, calcitonin and other compounds. 2001. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. McGraw-Hill. Tenth Edition. Section XII. 1715.
84. Martí G, Audí L, Esteban C, Oyarzábal M, Chueca M, Gussinyé M, Yeste D, Fernández-Cancio M, Andaluz P, Carrascosa A. 2004. Asociación de los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D con la diabetes mellitus tipo 1 en dos poblaciones españolas. *Med Clin (Barc).* 123 (8): 286-290.

85. Masuyama H, Brownfield CM, St-Arnaud R, MacDonald, PN .1997 .Evidence for ligand-dependent intramolecular folding of the AF-2 domain in vitamin D receptor-activated transcription and coactivator interaction. *Mol Endocrinol.* 11: 1507-1517.
86. Mathieu C, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R. 1992. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes.* 41: 1491-1495.
87. Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. 1994. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Diabetologia.* 37: 552-558.
88. Mathieu C, Adorini L. 2002. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med.* 8: 174-179.
89. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. 1997. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol.* 11: 1165-1179.
90. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, et al. 1997. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indians Asians. *Diabetologia.* 40: 971-975.
91. McDonnell DP, Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR, O'Malley BW. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science.* 235: 1214-1217.
92. McDonnell DP, Scott RA, Kemer SA, O'Malley BW, Pike JW. 1989. Functional domains of the human vitamin D₃ receptor regulate osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol.* 3: 635-644.
93. Metcalfe KA, Hitman GA, Pociot F, et al. 1996. An association between type 1 diabetes and the interleukin-1 receptor type 1 gene. *Hum Immunol.* 51: 41-48.
94. Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M, Fukazawa T, Kasuga A, Hirose H, Matsubara K, Shimada A, Saruta T. 2003. Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. *J Clin End Metab.* 88: 3137-3140.
95. Myers MA, Mackay IR, Rowley MJ, Zimmet PZ. 2001. Dietary microbial toxins and Type 1 diabetes – a new meaning for seed and soil. *Diabetologia.* 44: 1199-1200.
96. Nakayima S, Hsieh JC, MacDonald PN, Galligan MA, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR. 1994. The C-terminal region of the vitamin D receptor is essential to

form a complex with a receptor auxiliary factor required for high affinity binding to the vitamin D-responsive element. *Mol Endocrinol.* 8: 159-172.

97. Nejentsev S, Koskinen S, Sjoroos M. 1998. Distribution of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)-related HLA alleles correlates with the difference in IDDM incidence in four populations of the Eastern Baltic region. *Tissue Antigens.* 52: 473-477.
98. Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, Howson JMM, Rance H, Nutland S, Walker NM, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage D, Undlien DE, Ronnigen KS, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Gillespie KM, Ring SM, Strachan DP, Widmer B, Dunger D, Todd, JA. 2004. Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes.* 53: 2709-2712.
99. Nerup J, Platz P, Andersen OO et al. 1974. HLA-antigens and diabetes mellitus. *Lancet.* 1: 864-869.
100. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, et al. 1996. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Hum Mol Genet.* 5: 1075-1080.
101. Okita H, Ohtsuka T, Yamakage A. 2002. Polymorphism of the vitamin D₃ receptor in patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 294: 159-162.
102. Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. 1999. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes — the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia.* 42: 1395-403.
103. Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. 1991. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology.* 128: 1496-1504.
104. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. 2000. Vitamin D-receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron.* 85: 86-91.
105. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science.* 222: 1337-1339.
106. Pani MA, Knapp M, Donner H, et al. 2000. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes.* 49: 504-507.

107. Penna G, Adorini L. 2000. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* 164: 2405-2411.
108. Pérez F, Santos JL, Calvillán M, Carrasco E. 1998. Haplotipos de riesgo (HLA) en niños con diabetes mellitus insulino-dependiente: Estudio familiar. *Rev Med Chil.* 126: 1455-1463.
109. Perez-Bravo F, Riesco V, Albala C, Oyarzun A, Santos JL, Carrasco E. 2001. *Rev Med Chil.* 129 (6): 611-619.
110. Pérez-Bravo F, Serrano-Rios M, Gutierrez-Lopez M. 1995. Genetic analysis of HLA DRB1, DQA1 and DQB1 alleles and susceptibility to IDDM in Chilean subjects. *Diabetologia.* 38:378-379.
111. Pietropaolo M, Peakman M, Pietropaolo SL, Zanone MM, Foley Jr TP, Becker DJ, Becker DJ, Trucco M. 1998. Combined analysis of GAD65 and ICA 512 (IA-2) autoantibodies in organ and non-organ-specific autoimmune diseases confers high specificity for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun.* 11: 1-10.
112. Pyke DA. 1989. The genetic perspective-putting research into practice. In Larkins RG, Zimmet PZ, Chisholm A. eds. *Diabetes 1988.* Amsterdam, Excerpta Medica: 1227-1234.
113. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PMM. 1994. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J immunol.* 152: 3183-3188.
114. Rochel N, Tocchini-Valentini G, Egea PF, Juntunen K, Garnier JM, Vihko P, Moras D. 2001. Functional and structural characterization of the insertion region in the ligand binding domain of the vitamin D nuclear receptor. *Eur J Biochem.* 268: 971-979.
115. Rodríguez J. 2001. Vitamin D levels in postmenopausal women with low bone mineral density. *Rev Med Chile.* 129: 849-852.
116. Rostand SG. 1979. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences. *Hypertension* 30: 150-156.
117. Scragg R, Holdaway I, Singh V, Metcalf P, Baker J, Dryson E. 1995. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels decreased in impaired glucose tolerance and diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 27 (3): 181-188.

118. Scragg R, Sowers M, Bell C. 2004. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care*. 27 (12): 2813-2818.
119. Serrano-Ríos M, Gutierrez-López MD, Pérez-Bravo F, Martínez MT, Antona J, Rowley M, Mackay I, Zimmet P. 1996. HLA DR/DQ and anti-GAD antibodies in first degree relatives of Type 1 Diabetes Mellitus. *Diab Res Clin Pract*. 34 (Suppl): 133-139.
120. Serrano-Ríos M, Goday A, Martínez Larrad T. 1999. Migrant populations and the incidence of type 1 diabetes mellitus: an overview of the literature with a focus on the Spanish-heritage countries in Latin America. *Diabetes Metab Res Rev*. 15: 113-32.
121. Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, Plotnick L, Kaufman F, Laffel L, Deeb L, Grey M, Anderson B, Holzmeister LA, Clark N. 2005. Care of Children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 28 (1): 186-199.
122. Simmons JD, Mullighan C, Welsh KI, Jewell DP. 2000. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut*. 47: 211-214.
123. Solimena M, De Camilli P, Coxsackieviruses and diabetes. 1995. *Nat Med*. 1: 25-26.
124. Songer T. 1992. The economic costs of NIDDM. *Diabetes Metab Rev*. 8: 389-404.
125. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, et al. 1979. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract; stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science*. 206: 1188-1190.
126. Suarez-Pinzón WL, Rabinovitch A. 2001. Islet autoimmunity in type 1 diabetes mellitus is a cytokine regulated process. *Salud UIS*. 33: 4-31.
127. Sutton ALM, MacDonald PN. 2003. Vitamin D: More than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol*. 17: 777-791.
128. Taymans SE, Pack S, Pak E, Orban Z, Barsony J, Zhuang Z, Stratakis CA. 1999. The human vitamin D receptor gene is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: Genetic and physical VDR map. *J Bone Min Res*. 14: 1163-1166.

129. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. 1999. Vitamin D supplement in early childhood and risk for type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetología*. 42: 51-54.
130. Thorsby E, Ronningen KS. 1992. Role of HLA genes in predisposition to develop insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med*. 24: 523-531.
131. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. 1987. HLA DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 329: 599-604.
132. Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, et al. 1996. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*. 11: 1003-1009.
133. Trucco M, Dorman JS. 1989. Immunogenetics of insulin-dependent diabetes mellitus in humans. *Critical Rev Immunol*. 9: 201-245.
134. Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine A, Simell O, Knip M, Veijola R, Ilonen J. 2003. Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *Eur J Endocrinol*. 149: 591-596.
135. Vaarala O, Klemetti P, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J, Åkerblom HK. 1996. Cellular immune response to cow's milk β -lactoglobulin in patients with newly diagnosed IDDM. *Diabetes*. 45: 178-182.
136. Valenzuela CY, Acuña MP, Harb Z. 1987. Gradiente sociogenético en la población chilena. *Rev Med Chile*. 115: 295-299.
137. Virtanen SM, Jaakkola L, Räsänen L, Ylönen K, Aro A, Lounamaa R, Åkerblom HK, Tuomilehto J, the Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. 1994. Nitrate and nitrite intake and the risk for Type 1 diabetes in Finnish children. *Diabet Med*. 11: 656-662.
138. Vyse Tj, Todd JA. 1996. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*. 85: 311-318.
139. Wagenknecht LE, Roseman JM, Herman WH. 1991. Increased incidence of insulin-dependent diabetes mellitus following an epidemic of coxsackievirus B5. *Am J Epidemiol*. 133: 1024-1031.
140. Ward KP, Galloway WH, Auchterlonie IA. 1979. Congenital cytomegalovirus infection and diabetes. *Lancet*. I: 497.
141. WHO. 2002. Diabetes Mellitus. Fact Sheet N°138.

142. WHO DIAMOND Project Group. 1991. Familial IDDM epidemiology: standardization of data for the DIAMOND project. *Bull WHO*. 69: 767-777.
143. Williams AJ, Norcross AJ, Dix RJ, Gillespie KM, Gale EA, Bingley PJ. 2003. The prevalence of insulin autoantibodies at the onset of Type 1 diabetes is higher in males than females during adolescence. *Diabetologia*. 46 (10): 1354-1356.
144. Xiao B, Link H. 1997. Mucosal Tolerance: A two-edged sword to prevent and treat autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol*. 85: 119-28.
145. Yokota I, Satomura S, Kitamura S, et al. 2002. Association between vitamin D receptor genotype and age of onset in juvenile Japanese patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 25: 1244.
146. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. 1979. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetes ketoacidosis. *N Engl J Med*. 300: 1173-1179.
147. Yoon JW, Rayfield EJ. 1986. Two possible pathogenic mechanisms for virus-induced diabetes. In *The immunology of Diabetes Mellitus*, Molinar GD, Jaworski MA, eds. Elsevier Science Publisher. 287-298.