ALINE DANTAS COSTA RIQUELTO

**Análise genético-molecular por
sequenciamento paralelo em larga escala de
portadores das formas raras de diabetes
monogênico e lipodistrofias hereditárias**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Milena Gurgel Teles Bezerra

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Riquetto, Aline Dantas Costa

Análise genético-molecular por sequenciamento paralelo em larga escala de portadores das formas raras de diabetes monogênico e lipodistrofias hereditárias / Aline Dantas Costa Riquetto. -- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Milena Gurgel Teles Bezerra.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Diabetes monogênica 3.Diabetes mellitus neonatal 4.Síndrome de Wolfram 5.Diabetes mellitus lipoatrófica 6.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala

USP/FM/DBD-523/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia Genética (Laboratório de Investigação Médica, LIM/25), Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Sua realização teve colaboração da Unidade de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Apoio Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedicatória

A meu grande amor, meu marido Danilo, pelo amor e suporte incondicionais. Você é meu porto-seguro.

Às mulheres de minha vida: minha vovó Mada (*in memoriam*), eterna inspiração e incentivo à busca de meus sonhos; minha vovó Wanda, mulher determinada, de quem herdei a persistência; minha querida mamãe Lídia, melhor amiga, conselheira e grande incentivadora de minhas conquistas; minha filha Isabela, presente de Deus, que me apresentou o maior dos amores.

A meu pai, meu primeiro amor, por sempre acreditar em mim e me permitir voar tão alto quanto meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por Seu grande amor por nós, que me permitiu exercer a arte da Medicina e cuidar de vidas.

Agradeço a meus pais, José Wellington e Lídia, por todo o suporte educacional e emocional ao longo de minha vida acadêmica.

A meu marido, Danilo, por estar a meu lado, apoiando meus sonhos, suportando minhas ausências e incentivando minhas realizações profissionais.

A meus irmãos, José Wellington Neto e Leonardo, companheiros de jornada estudantil e exemplos de estudantes e profissionais.

Às irmãs que a vida me deu, Érica, Daiane e Mayara, por todo o apoio e torcida.

A meus sogros, Edisom e Raquel, por me aceitarem e cuidarem de mim como filha.

A meus avós, José Wellington, Wanda, Anísio e Magdalena (*in memoriam*). A história de vida de vocês me ensina que posso alcançar as mais difíceis realizações.

As minhas crianças: Isabela, por fazer essa conquista mais significativa, José Pedro e Bernardo. Vocês tornam meus dias mais alegres.

A minha orientadora, Dra. Milena Teles, pelos ensinamentos, disponibilidade, orientações, conselhos e amizade. Seu entusiasmo pela vida e pela carreira acadêmica são contagiantes. Obrigada por compartilhá-los dia a dia.

A meu coorientador Alex, por compartilhar seus ensinamentos.

A meus colegas Lucas, Lilian e Ana Elisa, pela oportunidade de aprendermos e crescermos juntos, tanto no conhecimento médico e genético, quanto na amizade.

Às professoras titulares, Profa. Dra. Berenice e Profa. Dra. Ana Cláudia, pelo apoio. À Dra. Marcia Nery pelo incentivo e orientações.

A todos os funcionários do LIM25 que colaboraram com este trabalho, Eliete, Graça, Geni e Elisângela.

A meus primeiros mestres na Endocrinologia, Dr. Carlos Longui, Dr. Luís Eduardo Calliari, Dr. Osmar Monte, Dra. Cristiane Kochi, Dra. Alexandra Malaquias, Dra. Renata Noronha e Dr. Mauro Borgui, por me instigarem a buscar uma carreira acadêmica.

A todos os médicos colaboradores e residentes.

Aos pacientes e familiares participantes desta pesquisa, que foram a força motriz de nosso trabalho e do desejo de crescimento profissional.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas e anexos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> - conceitos e panorama geral.....	2
1.2 Diabetes <i>mellitus</i> neonatal (DMN)	3
1.2.1 Aspectos moleculares	3
1.3 Síndrome de Wolfram (SW)	7
1.3.1 Aspectos moleculares.....	7
1.4 Lipodistrofias hereditárias	8
1.4.1 Lipodistrofia congênita generalizada ou Síndrome de Berardinelli-Seip	10
1.4.1.1 Aspectos moleculares	11
1.4.2 Lipodistrofia parcial familiar	12
1.4.3 Aspectos moleculares.....	13
1.5 Diagnóstico genético do diabetes monogênico	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos primários	18
2.2 Objetivos secundários	18
3 MÉTODOS	19
3.1 Considerações éticas	20
3.2 Casuística	20
3.3 Critérios de seleção	21
3.3.1 Diabetes neonatal	21
3.3.2 Síndrome de Wolfram	22
3.3.3 Lipodistrofias hereditárias	22
3.4 Avaliação complementar	22
3.5 Estudo genético-molecular	23
3.5.1 Extração do DNA genômico.....	24
3.5.2 Sequenciamento em larga escala	25

3.5.3	Análise dos dados do sequenciamento em larga escala (Bioinformática)	28
3.5.4	Utilização de ferramenta para detecção de deleções	31
3.5.5	Confirmação visual das variantes alélicas selecionadas	32
3.5.6	Sequenciamento automático tradicional (Sanger)	32
3.5.7	Análise da patogenicidade das variantes alélicas candidatas	32
4	RESULTADOS	35
4.1	Características clínico-laboratoriais dos probandos	36
4.1.1	Diabetes neonatal	36
4.1.2	Síndrome de Wolfram	36
4.1.3	Lipodistrofias hereditárias	37
4.1.3.1	Lipodistrofia congênita generalizada	37
4.1.3.2	Lipodistrofia parcial familiar	39
4.2	Sequenciamento em larga escala	45
4.2.1	Métrica das corridas	45
4.2.2	Variantes alélicas detectadas pelo painel	45
4.2.2.1	Diabetes neonatal	48
4.2.2.2	Síndrome de Wolfram	48
4.2.2.3	Lipodistrofias hereditárias	49
4.2.2.3.1	Lipodistrofia congênita generalizada	49
4.2.2.3.2	Lipodistrofia parcial familiar	51
5	DISCUSSÃO	57
5.1	Sequenciamento em larga escala	58
5.1.1	Métrica das corridas	58
5.1.2	Variantes candidatas detectadas	58
5.1.2.1	Diabetes neonatal	58
5.1.2.2	Síndrome de Wolfram	64
5.1.2.3	Lipodistrofias hereditárias	66
5.2	Considerações finais	75
6	CONCLUSÕES	76
7	ANEXOS	78
8	REFERÊNCIAS	141

Listas

ABREVIATURAS

<i>ABCC8</i>	Gene <i>ATP-binding cassette subfamily C member 8</i>
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
<i>AGPAT2</i>	Gene <i>1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2</i>
<i>AKT2</i>	Gene <i>AKT serine/threonine kinase 2</i>
Anti-GAD	Anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico
Anti-IA2	Anticorpo anti-tirosina fosfatase (<i>islet antigen 2</i>)
Anti-IAA	Anticorpo anti-insulina (<i>insulin autoantibody</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
<i>BSCL2</i>	Gene <i>Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2</i>
<i>CIDEA</i>	Gene <i>cell death-inducing DFFA-like effector c</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
CONTRA	<i>Copy Number Targeted Resequencing Analysis</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DXA	Densitometria por dupla emissão de raios-X
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMN	Diabetes neonatal
DMNP	<i>Diabetes mellitus</i> neonatal permanente
DMNT	<i>Diabetes mellitus</i> neonatal transitório
FMR	<i>trunk-to-leg fat mass ratio</i>
<i>FOXP3</i>	Gene <i>forkhead box P3</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
K _{ATP}	Canal de K ATP-dependente
<i>KCNJ11</i>	Gene <i>potassium channel inwardly rectifying subfamily J member 11</i>
Kir6.2	<i>inward-rectifier potassium ion channel</i>

LBD	<i>ligand binding domain</i>
LCG	Lipodistrofia congênita generalizada
LMNA	Gene <i>lamin A/C</i>
LPF	Lipodistrofias parciais familiares
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
PLIN1	Gene <i>perilipin 1</i>
PPARG	Gene <i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
PTRF	Gene <i>polymerase I and transcript release fator</i>
RNM	Ressonância nuclear magnética
SLE	Sequenciamento em larga escala
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SPA	Síndrome progeroide atípica
SUR1	sulfonylurea receptor 1
SW	Síndrome de Wolfram
TC	Tomografia computadorizada
TG	Triglicérides
UI	Unidades internacionais
USP	Universidade de São Paulo
VCF	<i>Variant call format</i>
ZFP57	Gene <i>zinc finger protein</i>

FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da célula betapancreática e local de atuação dos diferentes genes causadores de diabetes <i>mellitus</i> neonatal.....	6
Figura 2 -	Representação da formação da gota lipídica (GL) nos adipócitos.....	15
Figura 3 -	Número de pacientes incluídos no estudo, de acordo com o fenótipo	21
Figura 4 -	Representação esquemática das etapas do sequenciamento em larga escala	27
Figura 5 -	Fluxo da filtragem utilizada para selecionar as variantes alélicas identificadas	30
Figura 6 -	Imagens da densitometria de corpo inteiro de pacientes com lipodistrofia congênita generalizada	38
Figura 7 -	Imagens da densitometria de corpo inteiro de pacientes com lipodistrofia parcial familiar	40
Figura 8 -	Fluxograma dos casos analisados, demonstrando o número de variantes alélicas encontradas de acordo com cada fenótipo	45
Figura 9 -	Heredogramas das famílias de probandos com suspeita de diabetes monogênico raros em que foram encontradas variantes alélicas candidatas	47
Figura 10 -	Deleção do exon 3 e parte do exon 4 do <i>AGPAT2</i>	50
Figura 11 -	Estrutura e organização do gene <i>FOXP3</i> humano	59
Figura 12 -	Representação esquemática dos genes <i>KCNJ11</i> e <i>ABCC8</i> , suas respectivas proteínas e o canal de potássio ATP-dependente (K_{ATP})	61

Figura 13 - Alterações epigenéticas que podem levar ao DMN, destacando-se com a seta as mutações no <i>ZFP57</i>	63
Figura 14 - Estrutura hipotética da proteína wolframina com a localização das variantes encontradas nesse estudo	65
Figura 15 - Representação esquemática do gene <i>AGPAT2</i> e sua proteína, com a localização das variantes encontradas nesse estudo.....	67
Figura 16 - Representação esquemática do <i>BSCL2</i> e da seipina	68
Figura 17 - Representação esquemática do <i>LMNA</i> com a localização das variantes encontradas nesse estudo.....	70
Figura 18 - Representação esquemática do gene <i>AKT2</i>	72
Figura 19 - Representação esquemática da proteína PPARG e da região onde está a variante V318M	74

TABELAS

Tabela 1 -	Subtipos do diabetes neonatal de acordo com a etiologia molecular	4
Tabela 2 -	Classificação das lipodistrofias hereditárias de acordo com a etiologia molecular e o padrão de perda de gordura	9
Tabela 3 -	Características clínico-laboratoriais dos probandos com suspeita de diabetes neonatal	41
Tabela 4 -	Características clínico-laboratoriais dos probandos com suspeita de Síndrome de Wolfram	42
Tabela 5 -	Características clínico-laboratoriais dos probandos com suspeita de lipodistrofia congênita generalizada	43
Tabela 6 -	Características clínico-laboratoriais dos probandos com suspeita de lipodistrofia parcial familiar	44
Tabela 7 -	Variantes alélicas candidatas encontradas nos pacientes com suspeita clínica de diabetes monogênico	52
Tabela 8 –	Características clínico-laboratoriais e diagnóstico genético dos probandos com suspeita clínica de diabetes neonatal	53
Tabela 9 -	Características clínico-laboratoriais e diagnóstico genético dos probandos com suspeita de Síndrome de Wolfram.....	54
Tabela 10 -	Características clínico-laboratoriais e diagnóstico genético dos probandos com suspeita de lipodistrofia congênita generalizada	55
Tabela 11 -	Características clínico-laboratoriais e diagnóstico genético dos probandos com suspeita clínica de lipodistrofia parcial familiar	56

ANEXOS

Anexo 1 -	Termo de consentimento livre e esclarecido	79
Anexo 2 -	Formulários eletrônicos para seleção de casos de diabetes monogênico	82
Anexo 3 -	Transcritos referências dos genes relacionados a diabetes monogênico utilizados no presente estudo	116
Anexo 4 -	Métricas de sequenciamento em larga escala das corridas, correspondentes aos pacientes com diabetes monogênico	117
Anexo 5 -	Artigo em submissão para a revista <i>Diabetes Research and Clinical Practice</i>	118
Anexo 6 -	Artigo submetido na revista <i>Frontiers in Endocrinology</i>	132

Resumo

Riquetto ADC. *Análise genético-molecular por sequenciamento paralelo em larga escala de portadores das formas raras de diabetes monogênico e lipodistrofias hereditárias* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: O diabetes monogênico corresponde de 1% a 2% de todos os casos de diabetes *mellitus*, sendo causado por variantes em um único gene. Dentre esses, o mais comum é o MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), havendo, porém, diversas formas mais raras, como diabetes neonatal e sindrômico que podem estar associadas a outras comorbidades além do diabetes, bem como às lipodistrofias hereditárias. O diagnóstico genético permite a adequação do tratamento, seguimento clínico e aconselhamento familiar. **Objetivos:** (1) desenvolver e implantar um painel customizado de sequenciamento em larga escala para o diagnóstico genético-molecular das formas raras de diabetes monogênico e lipodistrofias hereditárias; (2) estabelecer o diagnóstico genético de casos com suspeita clínica; (3) realizar a correlação genótipo-fenótipo. **Métodos:** Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão para cada tipo de diabetes monogênico raro. A pesquisa genética dos casos-índice foi feita por sequenciamento em larga escala. A segregação familiar e confirmação dos achados foram feitas pelo método de Sanger. A análise de bioinformática foi realizada considerando o tipo de variante, frequência em bancos de dados populacionais, predição *in silico* e segregação familiar. **Resultados:** Foram analisados 42 casos, sendo que em 23 foram encontradas variantes candidatas: 6/16 com diagnóstico de diabetes neonatal, 2/2 com quadro clínico de Síndrome de Wolfram, 11/11 com suspeita de lipodistrofia congênita generalizada, 4/13 com lipodistrofia parcial familiar. **Conclusões:** Um painel customizado de sequenciamento em larga escala permitiu o diagnóstico genético-molecular de diabetes monogênico, com positividade de 22/42 casos analisados, sendo possível realizar a correlação genótipo-fenótipo. O diagnóstico genético possibilitou o aprimoramento do seguimento clínico dos pacientes e suas famílias. Permitiu, ainda, aumentar o número de diagnósticos de casos anteriormente subdiagnosticados.

Descritores: diabetes mellitus; diabetes monogênica; diabetes mellitus neonatal; síndrome de Wolfram; diabetes mellitus lipoatrófica; sequenciamento de nucleotídeos em larga escala.

Abstract

Riquetto ADC. *Targeted massively parallel sequencing for rare monogenic diabetes forms and inherited lipodystrophy* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction: Monogenic Diabetes accounts for 1 to 2% of all cases of diabetes mellitus. It is caused for variants in a single gene. Among these, the most common is MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), but there are several other rare forms, which may be associated with other comorbidities besides diabetes. Genetic diagnosis can lead to appropriate treatment and follow-up, besides and family counseling. **Objectives:** (1) to develop a customized targeted massively parallel sequencing panel to sequence the rare types of monogenic diabetes; (2) To establish the genetic diagnosis of probands with clinical suspicion of monogenic diabetes; (3) To correlate their phenotype with genetic findings, leading to a better understanding of rare monogenic diabetes subtypes. **Methods:** Patients were selected according to the inclusion criteria for each type of rare monogenic diabetes. Genetic research of index cases was done by massively parallel sequencing. Family segregation and confirmation of the variants findings were done by Sanger method. Bioinformatics analysis was performed considering the type of variant, frequency in population databases, in silico prediction and family segregation. **Results:** We analyzed a total of 42 cases. We found 22 candidate causal variants: 6/16 in probands with Neonatal Diabetes, 2/2 with Wolfram Syndrome, 11/11 with suspected Generalized Congenital Lipodystrophy, and 4/13 with Familial Partial Lipodystrophy. **Conclusions:** A customized targeted massively parallel sequencing panel allowed genetic diagnosis of rare types of monogenic diabetes, with a positivity of 23/42 cases analyzed, being possible to perform the genotype-phenotype correlation. The genetic diagnosis allowed the improvement of the clinical follow-up of the patients and their families. It also increased the number of diagnoses of previously underdiagnosed cases.

Descriptors: diabetes mellitus; monogenic diabetes; neonatal diabetes mellitus; wolfram syndrome; diabetes mellitus, lipoatrophic; high-throughput nucleotide sequencing.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes *mellitus* – conceitos e panorama geral

O termo diabetes *mellitus* (DM) descreve uma condição metabólica complexa e heterogênea, caracterizada por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na ação e, ou secreção de insulina (1). Afeta atualmente cerca de 425 milhões de pessoas em todo o mundo (2), sendo que no Brasil esse número é de 12.465 milhões, correspondendo a 8,7% da população (3). Sua etiologia é diversa, apesar de a maioria ser classificada em tipo 1 (5% a 10%) e tipo 2 (90% a 95%). O tipo 1 caracteriza-se por deficiência absoluta na secreção de insulina após agressão autoimune das células betapancreáticas, enquanto o tipo 2 resulta de uma resistência insulínica combinada a uma secreção inadequada da mesma. Além desses dois tipos, a Associação Americana de Diabetes (ADA) sugere outras duas categorias: diabetes gestacional e diabetes devido a outras causas, em que se encontra o diabetes monogênico (4).

Apesar de o DM1 e DM2 serem os mais prevalentes, torna-se fundamental a suspeição clínica dos tipos mais raros. Dentre eles, o diabetes monogênico corresponde aproximadamente de 1% de todos os tipos de DM (1,5). Resulta de um ou mais defeitos em um único gene que leva a uma redução de secreção de insulina ou diminuição do número de células betapancreáticas (6). Existem mais de 40 subtipos genéticos de diabetes monogênico identificados atualmente, tendo fenótipos variados e padrões de herança específicos. Pode ser herdado como um traço dominante, recessivo ou com um padrão não mendeliano. Pode ainda se apresentar como um caso espontâneo devido a uma mutação *de novo* (7). Dentre os diferentes tipos de DM monogênico, o mais frequente é o MODY – *Maturity Onset Diabetes of the Young*. O foco desse estudo são as outras

formas mais raras de diabetes monogênicos - diabetes *mellitus* neonatal (DMN), Síndrome de Wolfram (SW) e lipodistrofias hereditárias.

1.2 Diabetes *mellitus* neonatal (DMN)

O diabetes neonatal corresponde ao diabetes diagnosticado principalmente até os 6 primeiros meses de vida. Em alguns casos pode ocorrer entre 6 meses e 12 meses, porém a grande maioria dos diagnósticos nessa faixa etária são decorrentes de diabetes tipo 1 (7). De acordo com o estudo SWEET (8), o DMN corresponde a 0,3% dos casos de DM na infância. Além disso, tem incidência de um caso para cada 400.000 a 500.000 nascidos vivos (9). Pode ser dividido em dois grandes grupos com proporções semelhantes: diabetes mellitus neonatal permanente (DMNP) ou diabetes mellitus neonatal transitório (DMNT) (9,10). No DMNT ocorre remissão do diabetes nos primeiros meses de vida (9). Pode haver reincidência em aproximadamente 50% dos casos, normalmente na infância tardia ou puberdade.

1.2.1 Aspectos moleculares

Variantes em mais de 20 genes já foram associadas ao DMN (5,7).

A maioria dos pacientes com DMNT tem um defeito de metilação no cromossomo 6q24, resultando em aumento da expressão do *PLAGL1*. Esse defeito é decorrente de um dos três mecanismos: dissomia uniparental paterna, duplicação do alelo paterno ou metilação anormal do alelo materno (7,11).

A principal etiologia do DMNP é a deficiência insulínica, que pode ser causada pelo comprometimento da função ou desenvolvimento da célula beta, ou por sua progressiva destruição (7,10,11). A maioria corresponde a mutações ativadoras do canal de K ATP-dependente (K_{ATP}). Essas alterações acontecem nos genes *KCNJ11* e *ABCC8*, que codificam as

subunidades Kir6.2 e SUR1 desse canal, respectivamente, e prejudicam a liberação de insulina em resposta à hiperglicemia (12–14). *KCNJ11* é o gene mais frequentemente alterado e cerca de 20% dos casos podem se associar a sintomas neurológicos, como atraso do desenvolvimento e epilepsia de início precoce, resultando na chamada Síndrome de DEND (do inglês: *developmental delay, epilepsy e neonatal diabetes*) (12). As mutações no *ABCC8* também podem causar comprometimento neurológico, com menor frequência e habitualmente de forma mais branda (14). Mutações em heterozigose no gene da pró-insulina (*INS*) constituem a segunda causa de DMNP. Acarretam o acúmulo de moléculas alteradas de pró-insulina no retículo endoplasmático, gerando um estresse e apoptose da célula betapancreáticas. As mutações nos K_{ATP} e no *INS* correspondem de 50% a 75% dos casos de DMNP (15–17). A presença de consanguinidade exerce influência na prevalência e etiologia do DMN, sendo a mutação no *EIF2AK3* a principal etiologia nesses casos, causando a Síndrome de Wolcott-Rallison, que apresenta, além do DMN, displasia epifisária múltipla (7,18,19).

O quadro clínico e o modo de transmissão das mutações relacionadas ao DMN estão descritos na Tabela 1. A Figura 1 mostra o papel de diferentes genes na função e desenvolvimento da célula betapancreática.

Tabela 1 - Subtipos do diabetes neonatal de acordo com a etiologia molecular

Gene	Modo de herança	Aspectos clínicos
Desenvolvimento pancreático anormal		
<i>PLAGL1</i>	Variável (<i>imprintig</i>)	DMNT ± macroglossia ± hérnia umbilical
<i>ZFP57</i>	AR	DMNT (Síndrome da hipometilação múltipla) ± macroglossia ± atraso do desenvolvimento ± defeitos umbilicais ± doença cardíaca congênita
<i>PDX1</i>	AR	DMNP ± agenesia pancreática (esteatorreia)
<i>PTF1A</i>	AR	DMNP ± agenesia pancreática (esteatorreia) ± hipoplasia/aplasia cerebelar ± disfunção respiratória central
<i>RFX6</i>	AR	DMNP ± atresia intestinal ± agenesia de vesícula biliar
<i>GLIS3</i>	AR	DMNP ± hipotireoidismo congênito ± glaucoma ± fibrose hepática ± cistos renais

continua

Tabela 1 - Subtipos do diabetes neonatal de acordo com a etiologia molecular

(conclusão)

Gene	Modo de herança	Aspectos clínicos
<i>NEUROG3</i>	AR	DMNP ± enteropatia
<i>NEUROD1</i>	AR	DMNP ± hipoplasia cerebelar ± acuidade visual diminuída ± surdez
<i>PAX6</i>	AR	DMNP ± micro-oftalmia ± malformações cerebrais
<i>HNF1B</i>	AD	DMNT ± hipoplasia pancreática ± cistos renais
<i>GATA6</i>	AD	DMNP ± malformações cardíacas congênicas ± anormalidades biliares
Anormalidades na função as células-β		
<i>INS</i>	AR	DMNP ou DMNT isolados
<i>GCK</i>	AR	DMNP isolado
<i>SLC2A2</i>	AR	Síndrome de Fanconi-Bickel: DMNP + hipergalactosemia + disfunção hepática
<i>SLC19A2</i>	AR	Síndrome de Roger: DMNP + anemia megaloblástica responsiva à tiamina + surdez neurossensorial
<i>ABCC8</i>	AD ou AR	DMNT ou DMNP ± DEND
<i>KCNJ11</i>	AD	DMNT ou DMNP ± DEND
Destruição das células-β		
<i>EIF2AK3</i>	AR	Síndrome de Wolcott-Rallison: DMNP ± displasia esquelética ± disfunção hepática recorrente
<i>IER3IP1</i>	AR	DMNP + lisencefalia + microcefalia + encefalopatia epilética
<i>FOXP3</i>	Ligado ao X, AR	Síndrome IPEX: enteropatia autoimune, eczema, hipotireoidismo autoimune, aumento de IgE, anticorpos pancreáticos presentes
<i>INS</i>	AD	DMNP isolado
<i>LRBA</i>	AR	DMNP + síndrome proliferativa autoimune
<i>IL2RA</i>	AR	DMNP + síndrome proliferativa autoimune, hipotireoidismo
<i>GATA4</i>	AD	DMNP + atraso do desenvolvimento + cardiopatia congênita
<i>HYMAI</i>	Variável (<i>imprinting</i>)	DMNT + restrição de crescimento intrauterino, baixo ganho de peso
<i>NKX2-2</i>	AR	DMNP + atraso do desenvolvimento, hipotonia, baixa estatura, disfagia, constipação, deficiência auditiva bilateral
<i>MNX-1</i>	AR	DMNP + restrição de crescimento intrauterino, atraso do desenvolvimento, dificuldade de sucção e disfagia, bexiga neurogênica, deformidade em flexão dos membros inferiores, baixa estatura, hipoplasia pulmonar, hipoplasia renal, agenesia sacral, ânus imperfurado

AR: autossômica recessiva; AD: autossômica dominante; DMNT: diabetes neonatal transitório; DMNP: diabetes neonatal permanente; DEND: do inglês- *developmental delay* (atraso do desenvolvimento), *epilepsy* (epilepsia) e *neonatal diabetes* (diabetes neonatal).

Adaptado de (7)(20)(21)(22)(23)(24).

Figura 1 - Representação esquemática da célula betapancreática e local de atuação dos diferentes genes causadores de diabetes *mellitus* neonatal. Retirada de (11)

O diagnóstico molecular do DMN é fundamental para definir seu subtipo, determinando o tratamento mais adequado (25). Nos casos das mutações ativadoras dos K_{ATP}, por exemplo, até 90% dos pacientes respondem ao tratamento com altas doses de sulfonilureias, com suspensão da insulinoterapia, acarretando melhora do controle glicêmico e diminuição

dos episódios de hipoglicemia (7,10,14,25-28). Além disso, possibilita o aconselhamento genético, pois permite prever a recorrência em irmãos de casos índices, bem como em seus descendentes (25,29).

1.3 Síndrome de Wolfram (SW)

A SW caracteriza-se por diabetes diagnosticado até os 16 anos de idade, associado à atrofia do nervo óptico, podendo haver surdez neurossensorial, diabetes *insipidus* central, dilatações do trato urinário e sintomas neurológicos (10,30). Muitos pacientes têm o diagnóstico inicial de diabetes tipo 1, sendo que a perda de visão passa a ser associada à retinopatia diabética, já que se instala em média quatro anos após o diagnóstico do DM (30,31).

1.3.1 Aspectos moleculares

Noventa por cento dos pacientes são portadores de mutações recessivas no gene *WFS1* (32). Esse gene codifica uma proteína transmembrana, wolframina, que participa de vias reguladoras da apoptose do retículo endoplasmático em células betapancreáticas e neurônios e possui papel fundamental na biossíntese de insulina (33). Está presente em diversos tecidos, com maiores taxas de expressão no cérebro, pâncreas e coração. Apesar de não se conhecer precisamente sua função, sabe-se que sua deficiência leva a estresse do retículo endoplasmático, com prejuízo na progressão do ciclo celular, afetando a homeostasia do cálcio, acarretando apoptose celular (33,34). Outra variação da doença foi descrita, causada por mutações no *CISD2* (35), sem diabetes *insipidus*, na qual os pacientes desenvolvem doença ulcerosa péptica e diátese hemorrágica.

1.4 Lipodistrofias hereditárias

As lipodistrofias hereditárias constituem um grupo raro e heterogêneo de síndromes caracterizadas pela perda completa ou parcial de tecido adiposo subcutâneo (36,37). Dentre esses grupos, de acordo com a extensão e, ou padrão da perda de gordura, foram divididas ainda em generalizadas ou parciais, levando a quatro subtipos maiores: lipodistrofia congênita generalizada (LCG), lipodistrofias congênitas adquiridas, lipodistrofias parciais adquiridas e lipodistrofias parciais familiares (LPF) (36). A classificação das lipodistrofias hereditárias de acordo com a etiologia molecular e padrão de perda de gordura encontra-se na tabela 2. O foco desse estudo serão as lipodistrofias hereditárias, por terem etiologia monogênica. Existem aproximadamente mil casos descritos no mundo, divididos entre formas parciais e generalizadas. Sua prevalência estimada é de 1 em 1.000.000 (36–39).

Tabela 2 - Classificação das lipodistrofias hereditárias de acordo com a etiologia molecular e o padrão de perda de gordura

Gene	Modo de herança	Aspectos clínicos
Lipodistrofia Congênita Generalizada (LCG)		
<i>AGPAT2</i> <i>BSCL2</i> <i>CAV1</i> <i>PTRF</i> <i>PCYT1A</i> <i>PPARG</i>	AR	Ausência de quase todo o tecido adiposo desde o nascimento, aumento da musculatura, complicações metabólicas
Síndromes progeroides		
<i>LMNA</i> <i>ZMPSTE24</i> <i>SPRTN</i> <i>WRN</i> <i>BANF1</i>	AR	Anomalias esqueléticas, perda de gordura SC parcial ou generalizada, complicações metabólicas variadas
<i>LMNA</i> <i>FBN1</i> <i>CAV1</i> <i>POLD1</i> <i>KCNJ6</i>	AD	Anomalias esqueléticas, perda de gordura SC mais generalizada, falência renal prematura, aspecto progeroide
Lipodistrofia parcial familiar (LPF)		
<i>LMNA</i> <i>PPARG</i> <i>AKT2</i> <i>PLIN1</i>	AD	Perda de gordura SC nas extremidades, complicações metabólicas
<i>CIDEA</i> <i>LIPE</i> <i>PCYT1A</i>	AR	Perda de gordura nos membros
Síndrome SHORT		
<i>PIK3R1</i>	AD	Perda variável de gordura SC , complicações metabólicas

LCG: lipodistrofia congênita generalizada; LPF: lipodistrofia parcial familiar; AR: autossômica recessiva; AD: autossômica dominante; SC: subcutânea.

Adaptada de (36) (86)

1.4.1 Lipodistrofia congênita generalizada ou Síndrome de Berardinelli-Seip

Clinicamente, a LCG caracteriza-se pela extrema redução de tecido adiposo desde o nascimento ou no primeiro ano de vida, associada à hipertrofia muscular e flebomegalia. São ainda achados da síndrome o aumento da velocidade de crescimento com aspecto corporal acromegálico, o avanço da idade óssea e do desenvolvimento dentário, a proeminência umbilical, a hepatoesplenomegalia e a cardiomegalia, além da hiperfagia na infância inicial. Os pacientes com LCG apresentam grave resistência insulínica (36,37,39–41). No sexo feminino, ovários policísticos, hirsutismo, clitoromegalia, irregularidade menstrual e/ou infertilidade podem fazer parte da síndrome (37,42). Ao longo dos anos, usualmente na puberdade tardia ou no início da idade adulta, os pacientes podem desenvolver DM com necessidade de altas doses de insulina (37,43). Alterações do metabolismo lipídico, como hipertrigliceridemia precoce, quilomicronemia, aumento dos ácidos graxos livres e baixos níveis de HDL são achados comuns (43,44). Consequentemente, os pacientes podem apresentar xantomas e não raramente desenvolver pancreatite aguda. Hepatomegalia por infiltração gordurosa no fígado pode ocorrer, podendo progredir para esteato-hepatite, cirrose e falência hepática como complicação tardia (37).

As dosagens séricas de leptina são baixas, dada a pouca quantidade de tecido adiposo (43), sendo que seu nível relaciona-se negativamente com os distúrbios metabólicos (36,45–47).

O diagnóstico diferencial da LCG deve ser feito com as lipodistrofias generalizadas adquiridas, síndromes progeroides atípicas, síndrome de Rabson-Mendenhall, síndrome de Donohue (mutações no *INSR*) e síndrome progeroide neonatal (39). É também diagnóstico diferencial da LCG a displasia mandibuloacral (mutações no *LMNA* e *ZMPSTE24*) (39,42).

1.4.1.1 Aspectos moleculares

Em 1999, Garg *et al.* evidenciaram uma ligação entre LCG e o *locus* 9q34 (48) e, em 2002, Agarwal *et al.* identificaram 11 mutações em homozigose ou heterozigose composta no gene *AGPAT2*, localizado nessa região (49). O *AGPAT2* codifica uma proteína da família das aciltransferases: 1-acilglicerol-3-fosfato-0-aciltransferase-2, fundamental para a biossíntese de triacilglicerol e glicerofosfolípidos (49). Outro *locus* foi identificado por Magré *et al.* em 2001, no cromossomo 11q13 (50). Os indivíduos afetados também eram homozigotos ou heterozigotos compostos para alterações no gene *BSCL2*. Esse gene codifica a proteína seipina, que exerce um papel na formação da vesícula lipídica e está envolvida na diferenciação dos adipócitos (51).

Em 2008, Kim *et al.* descreveram mais uma mutação na etiologia da LCG em uma paciente pertencente a uma família brasileira consanguínea, homozigota para uma mutação no exon 2 do gene *CAV1* (52). A caveolina-1 (Cav-1) é uma proteína da membrana plasmática que é essencial para a formação da cavéola e atua como uma proteína conectora, organizando complexos macromoleculares na superfície celular para sua eficiente localização e sinalização intracelular. Ela se liga a ácidos graxos e os transloca para a vesícula lipídica (53,54).

Em 2009, Hayashi *et al.* (55) identificaram uma mutação em homozigose no exon 2 do gene *PTRF*, que codifica a proteína cavina, envolvida na biogênese da cavéola e regula a expressão das caveolinas 1 e 3.

Dentre os genes descritos, as mutações no *AGPAT2* e *BSCL2* correspondem à maioria dos casos de LCG. Uma parcela dos casos não possui alteração molecular identificada (39).

1.4.2 Lipodistrofia parcial familiar

A LPF caracteriza-se pela perda variável e progressiva de gordura em braços e pernas, resultando em aparência de hipertrofia muscular, com perda variável no abdome anterior e tórax (36,56,57). A perda de tecido adiposo inicia-se durante a infância, puberdade ou quando adulto jovem. Muitos pacientes, especialmente do sexo feminino, têm acúmulo de gordura em face, pescoço e região intra-abdominal, levando a uma aparência *cushingoide*. Os indivíduos não raramente são confundidos como portadores de síndrome metabólica e, ou DM 2, sendo necessário um exame clínico acurado e cuidadoso para que o diagnóstico de LPF possa ser considerado. No sexo masculino, esse reconhecimento se torna ainda mais difícil, pelo aspecto habitualmente mais musculoso dos homens e, muitas vezes, só é realizado após uma familiar do sexo feminino ter seu diagnóstico confirmado (57).

Existem alguns métodos que permitem a avaliação clínica da composição corporal, entre eles as medidas antropométricas e exames de imagem. Dentre os exames de imagem, a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância nuclear magnética (RNM) são os mais utilizados em trabalhos científicos para comparar a distribuição da gordura corporal (56,58–61). A densitometria por dupla emissão de raios-X (DXA) tem sido usada para quantificar a gordura corporal bem como sua distribuição em pacientes com LPF. Apesar de ainda não haver valores de corte, a DXA é um método diagnóstico preciso que pode contribuir significativamente para o diagnóstico clínico da LPF (62). A DXA apresenta algumas vantagens. Uma delas é a baixa radiação quando comparada à TC. Além disso, a DXA permite uma estimativa precisa da massa gordurosa, com uma margem de erro de 2% a 6%. É, assim, um método fácil, rápido, não invasivo e mais barato (63). Existem poucos estudos descrevendo o uso de DXA em pacientes com lipodistrofia, sendo que a maioria foi realizada em pacientes com lipodistrofia associada ao tratamento antirretroviral (64,65). A relação de gordura tronco-pernas (*trunk-to-leg fat mass ratio*) ou FMR tem sido usada nesses casos. Até o momento, porém, não há valores de corte para o

diagnóstico de lipodistrofia relacionada ao HIV (66). Bonnet *et al.* estudaram 162 homens infectados pelo HIV e 241 controles. FMR foi usado para distingui-los, com um valor de corte de 1.3 ± 0.2 (67).

Em relação às lipodistrofias hereditárias, Valerio *et al.* avaliaram 5 mulheres; 3 delas com LPF, 1 com lipodistrofia adquirida e outra com LCG. Foram encontradas diferenças marcantes nas pacientes com LPF, que apresentaram FMR acima do ponto de corte sugerido por Bonnet, com valores entre 2.38 a 1.8 (68). Em 2012, Valerio *et al.* estudaram 18 mulheres com LPF e 16 controles, com FMR de 1.86 ± 0.43 vs. controles 0.93 ± 0.10 ($p < 0.001$) e estabeleceram um ponto de corte FMR de 1.2 (59). A DXA permite também a avaliação da massa muscular. Ji *et al.* compararam pacientes com LPF com controles e encontraram aumento significativo do volume e massa no primeiro grupo (69).

As LPF estão associadas a complicações metabólicas em diferentes graus e, em alguns casos, à miopatia, cardiomiopatia, distúrbios de condução e insuficiência cardíaca congestiva (37).

As alterações metabólicas se manifestam cedo na fase adulta, podendo variar desde intolerância à glicose assintomática com dislipidemia leve até DM com acentuada resistência insulínica, dependendo do grau de perda de gordura (44). A maioria das mulheres afetadas mantém função reprodutiva, embora algumas desenvolvam hirsutismo e irregularidade menstrual sugestivas de síndrome dos ovários policísticos em idade precoce. Hipertrigliceridemia é um achado comum e pode ser grave, levando a episódios de pancreatite aguda. Por outro lado, a esteatose hepática e acantose nigricante podem ser menos expressivas clinicamente do que nas LCG (37).

1.4.2.1 Aspectos moleculares

As LFP são, em sua grande maioria, transmitidas de forma autossômica dominante. A partir de 1998 o *locus* da variante de Dunnigan foi identificado no cromossomo 1q21-22 (70), sendo identificada uma mutação

no *LMNA* que codifica a laminina do tipo A, um dos principais componentes da membrana nuclear (71–73). A abordagem de identificação por gene candidato levou à identificação de quatro outros genes em pacientes com LFP: *PPARG*, que codifica receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (74), fator de transcrição envolvido na diferenciação dos adipócitos; *AKT2*, que codifica o homólogo do oncogene viral v-akt de timoma murino 2 (75); *CIDEA*, da família das proteínas indutoras de morte celular (76), e *PLIN*, que codifica a perilipina 1 (77), ambos envolvidos na manutenção da vesícula lipídica (44).

A forma mais comum de LFP é a tipo 2 (Dunnigan), devido à mutação no gene *LMNA*, tendo 300 a 500 casos descritos (39), enquanto apenas aproximadamente 30 casos de LFP tipo 3, causada pela mutação no *PPARG* (78–81) foram relatados, com raros casos descritos de mutações no *AKT2* (75), *PLIN1* (77) e *CIDEA* (76). No entanto, há muitos pacientes com fenótipo sugestivo de LFP sem mutações nos principais genes descritos.

No Brasil, Mory *et al.* descreveram a variabilidade fenotípica associada a mutações no *LMNA* ao estudar 21 pacientes com lipodistrofia, dos quais 12 foram classificados como LFP típica; 7, como quadros atípicos e 2, como lipodistrofia generalizada. Todos os casos típicos, 2 dos casos atípicos e 1 dos casos de acometimento generalizado tiveram mutações no *LMNA* identificadas (58). Monteiro *et al.* descreveram, também, um grupo de 14 mulheres com características fenotípicas típicas de LFP do tipo Dunnigan, encontrando mutações no *LMNA* em todas (82). A Figura 2 ilustra o papel das principais proteínas envolvidas na formação da gota lipídica e, conseqüentemente, dos adipócitos.

Fonte: Retirada de (36).

Figura 2 - Representação da formação da gota lipídica (GL) nos adipócitos. A GL armazena triglicérides. Forma-se a partir de gotas menores no retículo endoplasmático, que se fundem para formar uma GL maior. Muitas proteínas participam de sua formação. A figura ilustra o papel das principais proteínas na formação da GL, entre elas caveolina, lâminas, AGPAT e seipina, que contribuem também para o estoque de lipídios nos adipócitos, levando a um adequado desenvolvimento. A caveolina forma a cavéola, que transloca o ácido graxo para a gota lipídica. O *PTRF* codifica a cavina, fator essencial na formação da cavéola. A proteína CIDEA e seipina participam da fusão das gotículas de lípidos para formação de uma gota maior. Além disso, a seipina participa da diferenciação dos adipócitos. A perilipina 1 é essencial para o armazenamento de gordura e lipólise hormônio-mediada. A AGPAT é uma enzima chave para a formação de triglicerídeos e fosfolípidos. Finalmente, a lamina é uma proteína estrutural que compõe a lâmina nuclear

1.5 Diagnóstico genético do diabetes monogênico

A confirmação do diagnóstico do diabetes monogênico é feita por exame genético-molecular (25,38). O exame molecular é fundamental porque, além de confirmar o diagnóstico, classifica o subtipo de diabetes e pode prever o provável curso clínico. Muitos casos de diabetes monogênico são erroneamente diagnosticados como DM tipo 1 ou tipo 2. Uma peculiaridade seria no caso das LPF, em que o fenótipo é facilmente confundido com síndrome metabólica, principalmente no sexo masculino, pelo padrão androide de distribuição de gordura (37). Além disso, a detecção da alteração molecular é importante para aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal das famílias afetadas, bem como na melhora do seguimento e plano terapêutico dos pacientes acometidos (10,25,38,83).

Tradicionalmente, o diagnóstico molecular é direcionado pelo fenótipo e realizado pelo sequenciamento do gene suspeito pelo tradicional método de Sanger (84). No entanto, a análise genética não é realizada de forma rotineira, pois o sequenciamento por Sanger pode ser um processo oneroso e relativamente demorado. Este fato poderia justificar o baixo índice de investigação molecular e subdiagnósticos.

O sequenciamento em larga escala (SLE) (85) mostra-se como possibilidade para tornar a análise genética mais custo efetiva na suspeita de diabetes monogênico, principalmente para identificar alterações em genes pouco estudados já associados a cada fenótipo, ampliando o espectro de alterações clínicas relacionadas a cada genótipo (39,86, 89).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários

Desenvolver e implantar um painel customizado de sequenciamento em larga escala para o diagnóstico genético-molecular dos casos raros de diabetes monogênico.

2.2 Objetivos secundários

Estabelecer o diagnóstico genético de casos com suspeita clínica de diabetes monogênico.

Correlacionar os achados moleculares às características clínicas dos pacientes avaliados, ampliando a correlação genótipo-fenótipo associada a cada mutação.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki e pelos termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Foi solicitada sua inclusão como subprojeto do protocolo de pesquisa “Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico”, aprovado pela comissão de ética em pesquisa. O termo de consentimento livre e esclarecido, bem como o termo de assentimento, foram obtido de todos os pacientes maiores de 18 anos ou pais ou tutores, antes que os procedimentos de pesquisa fossem iniciados (Anexo 1).

3.2 Casuística

Foram estudados 42 pacientes com suspeita clínica de diabetes monogênico. Os pacientes foram selecionados do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e de outros serviços de Endocrinologia de hospitais colaboradores, que os encaminharam via preenchimento de formulário eletrônico disponível no *site* do Grupo de Diabetes Monogênico da Universidade de São Paulo (USP) (87). Em seguida, foram avaliados e, enquadrando-se nos critérios de inclusão, direcionados para a pesquisa. Os formulários eletrônicos estão disponíveis no Anexo 2.

Foram realizadas seis corridas de SLE, correspondendo a 16 casos com suspeita clínica de DMN, 2 com SW e 24 com lipodistrofias hereditárias.

O número de pacientes incluídos, de acordo com o fenótipo, encontra-se na Figura 3.

Figura 3 - Número de pacientes incluídos no estudo, de acordo com o fenótipo

3.3 Critérios de seleção

3.3.1 Diabetes neonatal (7,10)

- Diabetes associado a uma ou várias condições:
 - Diagnóstico < 6 meses
 - Diagnóstico entre 6 meses e 12 meses
 - com autoanticorpos relacionados ao DM negativo
 - Diagnóstico < 6 meses ou entre 6 meses e 12 meses e com características clínicas da síndrome IPEX: autoanticorpos relacionados ao DM positivo, sexo masculino, associado a diarreia crônica, eczema, tireoidite, nefropatia ou doenças hematológicas.

3.3.2 Síndrome de Wolfram (30)

- Diabetes com autoanticorpos relacionados ao DM negativo e
- Atrofia óptica bilateral

3.3.3 Lipodistrofias hereditárias (37)

- Perda ou ausência de gordura subcutânea de um modo parcial ou generalizado

ou

- Perda de tecido subcutâneo, tipicamente ocorrendo durante ou após a puberdade, acometendo extremidades e, ou região glútea, poupando ou levando ao acúmulo de gordura na face, pescoço ou região intra-abdominal

Critérios de exclusão:

- antecedente de paniculite
- uso de antirretrovirais

3.4 Avaliação complementar

Os probandos foram avaliados do ponto de vista clínico-laboratorial de acordo com o fenótipo. Em todos os casos, o diagnóstico de DM foi feito de acordo com as recomendações da ADA (4).

Nos pacientes com DMN avaliou-se idade ao diagnóstico do DM, tratamento inicial e atual, presença de remissão e, ou recorrência do DM, presença de comorbidades, autoanticorpos (um ou mais dos seguintes: anti-GAD, anti-IAA, anti-IA2 – radioimunoensaio) e tempo entre o diagnóstico e a dosagem do anticorpo.

Nos pacientes com lipodistrofia foram dosados triglicerídeos, colesterol total e frações (método colorimétrico enzimático) e leptina (método imunoenzimático), além de realizado ultrassom abdominal. Em alguns casos foi possível a realização de DXA e, quando indicado, ecocardiograma.

3.5 Estudo genético-molecular

O SLE foi direcionado para regiões gênicas alvo, por meio de um painel elaborado por nosso Grupo de Diabetes Monogênico. O painel incluiu os seguintes genes:

- 17 genes relacionados a DMN:
 - *PTF1A, NEUROG3, RFX6, ZFP57, GLIS3, IER3IP1, GATA6, GATA4, EIF2AK3, SLC19A2, SLC2A2, CP, PLAGL1, HYMAI, PAX*6, NKX2-2* e MNX1**;
- 7 genes relacionados a DMN e MODY:
 - *GCK, PDX1, HNF1B, NEUROD1, INS, ABCC8, KCNJ11*;
- 7 genes relacionados a MODY:
 - *HNF4A, HNF1A, KLF11, CEL, PAX4, BLK, APPL1**;
- 1 gene relacionado a diabetes autoimune monogênico e a DMN
 - *FOXP3*;
- 1 gene relacionado a diabetes autoimune monogênico
 - *STAT3 e AIRE**;
- 2 genes relacionados à Síndrome de Wolfram
 - *WFS1 e CISD2*;
- 1 gene associado às síndromes de resistência insulínica
 - *INSR*;

- 11 genes relacionados a lipodistrofias
 - LCG
 - *AGPAT2, BSCL2, CAV1, PTRF*;
 - LPF
 - *LMNA, PLIN1, ZMPSTE24, AKT2, CIDEC, TBC1D4, PPARG*;
- 3 genes de hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar
 - *HADH, GLUD1 e SLC16A*;
- Genoma mitocondrial completo.

*genes adicionados a partir da terceira corrida

A escolha dos genes que compõem o painel foi feita de acordo com os dados de etiologia genética descritos na literatura. Como o painel está sendo utilizado para pesquisa de MODY em outro projeto, esses pacientes são sequenciados numa mesma corrida. Além disso, os genes relacionados à hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar foram incluídos como potenciais candidatos a novos casos de MODY e DMN.

3.5.1 Extração do DNA genômico

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico ou de células extraídas por *swab* da mucosa oral dos indivíduos incluídos na pesquisa. O DNA foi extraído de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Celular/ LIM25, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo (88). A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 nm e 280 nm para a caracterização da pureza do material é superior a 1,75. As amostras foram mantidas congeladas a – 20oC até seu uso.

3.5.2 Sequenciamento em larga escala

O sequenciamento em larga escala foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA 92122, United States). É apropriada para estudos que envolvem genômica humana pelas baixas taxas de erro. Além disso, é a tecnologia dominante na atualidade, suportada pelas principais ferramentas de bioinformática.

O processo do sequenciamento envolve três etapas fundamentais:

1. Confeção de bibliotecas de fragmentos de DNA.
 - a. Foram obtidas a partir da fragmentação mecânica do DNA genômico (Covaris, Woburn, Massachusetts, USA).
 - b. Estas bibliotecas são altamente enriquecidas em sequências provenientes das regiões codificadoras dos genes. Este enriquecimento é realizado por meio de diversas metodologias de captura, nas quais sondas biotiniladas (ou “iscas”) ligam-se por complementaridade às regiões gênicas de interesse, permitindo uma posterior “captura” destas regiões por *beads* magnéticos acoplados à estreptavidina. Posteriormente, estes fragmentos são recuperados e moléculas adaptadoras são acopladas em suas extremidades. Após cada etapa, os fragmentos de DNA são purificados.
 - c. A quantidade e qualidade dos fragmentos de DNA de cada amostra foi avaliada, usando-se o *Tape Station* (Agilent Technologies).
2. Amplificação clonal: os fragmentos de DNA ligados às moléculas adaptadoras são depositados em uma lâmina especial denominada *flowcell*, constituída por oito canaletas em cuja superfície encontram-se fixados de maneira paralela duas espécies de oligonucleotídeos, complementares às moléculas adaptadoras acopladas às extremidades dos fragmentos de DNA da biblioteca.

Após a ligação dos fragmentos a seus oligonucleotídeos complementares presentes na superfície da lâmina, cada molécula é amplificada várias vezes por meio de uma reação conhecida como PCR em ponte. Ao final, são gerados *clusters* (clones) de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da *flowcell*.

3. Sequenciamento: após a amplificação clonal, as moléculas *antisense* são removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento é iniciado com o acoplamento de um *primer* especial. Em seguida, nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis marcados com fluoróforos específicos para cada nucleotídeo são adicionados ao meio. A cada ciclo de incorporação são geradas imagens de toda a superfície da *flowcell* por meio de um *scanner* de fluorescência em cada um dos comprimentos de onda (específico para cada fluoróforo). Os *clusters* presentes na superfície da *flowcell* são então identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada ciclo de incorporação propicia a identificação da sequência de bases nucleotídicas de cada *cluster* de moléculas, ou seja, a sequência do fragmento que deu origem ao *cluster*.

As etapas do sequenciamento descritas acima estão representadas na Figura 4.

Fonte: Retirada de (89)

Figura 4 - Representação esquemática das etapas do sequenciamento em larga escala

A abordagem de sequenciamento realizada teve como intuito obter métricas de, no mínimo, 20x de cobertura nas regiões codificadoras dos genes selecionados, número amplamente aceito na literatura para a avaliação de variantes germinativas (90).

A soma dos fragmentos alvo dos genes de diabetes monogênico da primeira e segunda corrida é de 477 kb, mas a partir da terceira corrida é de 487 kb, já que alguns genes foram adicionados.

3.5.3 Análise dos dados do sequenciamento em larga escala (Bioinformática)

Os sequenciadores de nova geração geram um grande volume de dados, muitos não relacionados ao fenótipo (polimorfismos). Assim, é necessária a utilização de ferramentas de bioinformática altamente sofisticadas, a fim de que as poucas alterações genéticas de interesse sejam identificadas em meio a centenas ou milhares de alterações. Este processo é realizado por diversos programas de computador que funcionam em cadeia.

Inicialmente, os dados brutos gerados pelo sequenciador (as sequências propriamente ditas) precisam ser mapeados e alinhados no genoma-referência. Em seguida, são listadas todas as alterações divergentes da sequência-referência (tipicamente, algumas centenas ou milhares de alterações, o que tornaria impossível a verificação manual de cada uma). É feito um processo automatizado de “filtragem” destas alterações, tipicamente por meio da comparação com informações com bancos de dados públicos ou, ainda, pelo emprego de algoritmos que predizem *in silico* o impacto funcional de determinadas variantes.

A partir dos arquivos gerados no processo de sequenciamento de nova geração do DNA das amostras, a análise de bioinformática foi realizada nas seguintes etapas:

- [1] checagem da consistência dos arquivos (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de *gigabytes*) e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas. Esta etapa utiliza programas padrão de cálculo de integridade como md5sum;
- [2] alinhamento das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (hg19 UCSC ou b37 GRC/NCBI). Nesta etapa, a origem de cada fragmento do DNA da amostra é determinada. Será utilizado o programa BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>);

- [3] recalibragem das sequências alinhadas. Como o alinhamento é feito sequência a sequência, individualmente, torna-se necessário recalibrar o alinhamento realizado na fase anterior, visto que, em algumas situações, diferentes sequências oriundas da mesma região cromossômica apresentam resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (por exemplo, quando existem pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma alvo). A recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma contextualizada. Para tanto, é utilizada a ferramenta GATk (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>);
- [4] genotipagem. A partir do melhor alinhamento possível, é realizada a genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de cada par do cromossomo para uma dada posição). GATK também é utilizado para esta etapa. Esta ferramenta identifica SNPs e Indels;
- [5] recalibragem da genotipagem. Na fase anterior, os genótipos são calculados, levando em conta apenas os dados disponíveis do alinhamento. Uma correção ou recalibragem deve ser realizada a fim de que outros parâmetros sejam considerados, principalmente populacionais. Sucintamente, nesta fase, falsos positivos são detectados e sinalizados a fim de que sejam descartados do processo. Novamente, módulos do GATK realizam esta tarefa para SNPs e Indels. CNVs identificados não são recalibrados e passam diretamente para a próxima etapa da análise;
- [6] anotação e análise das variantes detectadas (Figura 5).

VCF: (*variant call format*) variantes detectadas; MAF (*minor allele frequency*): frequência alélica mínima

Figura 5 - Fluxo da filtragem utilizada para selecionar as variantes alélicas identificadas

Esta etapa consiste em:

- anotação das variantes encontradas (com Annovar - <http://www.openbioinformatics.org/annovar/> - e SnpEff - <http://snpeff.sourceforge.net/>);
- as variantes alélicas encontradas foram avaliadas quanto às suas frequências na população normal, a partir de bancos de dados públicos que compreendem mais de 99% das variantes alélicas existentes em seres humanos (EXAC - <http://exac.broadinstitute.org/>; 1.000 Genomes - <http://www.1000genomes.org/>; NHLBI ESP (Exome sequencing project)- <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Além disso, bancos nacionais também foram utilizados (<http://abraom.ib.usp.br/>). Variantes alélicas ausentes nestes bancos de dados também foram

avaliadas em 150 indivíduos controles pertencentes a banco de controles estabelecidos anteriormente a este estudo. Este número de indivíduos, que corresponde a 300 alelos analisados, tem o poder estatístico de 95% de afastar uma frequência alélica maior que 1% para as variantes identificadas;

- (c) foram, então, selecionadas as variantes em regiões codificadoras e ± 5 pb da região intrônica;
- (d) foi estimado o efeito de cada variante, por exemplo, se neutro ou deletério na proteína sintetizada. Além da análise do tipo da variante, foram utilizados programas de predição *in silico*;
- (e) finalmente, as variantes de interesse marcadas foram analisadas para os parâmetros presentes no algoritmo.

Ferramentas de bioinformática específicas para cada uma destas alterações estão disponíveis em nosso serviço.

A partir da seleção das variantes candidatas, foi realizada a confirmação por Sanger e segregação familiar.

As variantes alélicas confirmadas foram, então, classificadas de acordo com os critérios da *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (91).

3.5.4 Utilização de ferramenta para detecção de deleções

Uma limitação do algoritmo descrito acima é a baixa detecção de grandes deleções ou duplicações (CNV: *copy number variation*). Entretanto, uma ferramenta denominada CONTRA (*Copy Number Targeted Resequencing Analysis* – Análise de número de cópias sequenciadas) - <http://contra-cnv.sourceforge.net> - permite sua detecção, baseada em razões logarítmicas que inferem o ganho ou perda de número de cópias para cada região.

3.5.5 Confirmação visual das variantes alélicas selecionadas

O *software Integrative Genomics Viewer (IGV)* - <http://software.broadinstitute.org/software/igv/> - permite a visualização das variantes selecionadas. Assim, foi possível descartar as variantes chamadas erroneamente durante a genotipagem. Além disso, sua utilização permite identificar deleções não detectadas pelas etapas de bioinformática.

3.5.6 Sequenciamento automático tradicional (Sanger)

As alterações identificadas foram confirmadas por sequenciamento pela técnica de Sanger, bem como a segregação familiar (84). Em resumo, o DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação da região codificadora dos genes associados, utilizando *primers* flanqueando a região alvo, que é amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR). Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo. Os produtos amplificados foram submetidos a uma purificação enzimática com a enzima ExoSAP-IT, conforme a recomendação do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)*. Os produtos desta reação foram submetidos a uma eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)*. A leitura dos eletroferogramas foi realizada pelo programa *Sequencher 4.10.1 (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, EUA)*.

3.5.7 Análise da patogenicidade das variantes alélicas candidatas

As variantes alélicas selecionadas de acordo com a descrição anterior foram classificadas quanto a seu grau de patogenicidade, conforme as recomendações da ACMG, considerando (91):

- [1] Frequência alélica em bancos de dados genômicos populacionais, em especial dados obtidos das seguintes fontes:

- GnomAD (*Genome Aggregation Database*), uma coalisão internacional que reúne dados de SLE de vários estudos e bancos populacionais como *1000 Genomes*; *NHLBI ESP*; *ExAC (Exome Aggregation Consortium)*; o conjunto de dados genômicos fornecidos no website <http://gnomad.broadinstitute.org/> abrange mais de 120.000 sequências de exomas e mais de 15.000 sequências de análises completas do genoma de indivíduos não relacionados, sequenciados como parte de vários estudos específicos de algumas doenças e estudos genéticos populacionais.
- ABraOM (*Arquivo Brasileiro Online de Mutações*): banco de dados exômicos da população brasileira, disponível no website <http://abraom.ib.usp.br/>; reúne dados obtidos a partir de exomas de 609 indivíduos idosos (1218 alelos), em colaboração no estudo SABE (<http://www.fsp.usp.br/sabe/>) com o Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP; funciona como banco de controles locais da variabilidade genética brasileira.

[2] Segregação familiar:

Para auxiliar a interpretação dos dados de cossegregação familiar, um método matemático (92) foi adicionado às diretrizes da ACMG. O modelo proposto permite uma análise quantitativa dos dados de cossegregação (expressando a probabilidade de ocorrer segregação se a variante não for patogênica, ou seja, informando a chance de a variante observada ocorrer ao acaso ao invés de acontecer pela transmissão da alteração alélica associada à herdabilidade da doença).

[3] Dados preditivos:

- a) Tipo de variante: certos tipos alteram frequentemente a função do gene (*null variants*) - *nonsense*, *frameshift*, variantes em sítios canônicos de *splice* ($\pm 1-2$ pb), códon de iniciação, deleção de um ou vários exons.
- b) Predição *in silico*: evidências computacionais de efeito deletério no gene ou no produto gênico (como conservação do aminoácido

afetado entre espécies; localização da alteração na sequência da proteína e seu impacto funcional, consequência bioquímica da substituição do aminoácido).

- [4] Estudos funcionais *in vitro* ou *in vivo* (descrições na literatura que apoiem um efeito deletério sobre o gene ou sobre o produto gênico).

Considerando os critérios acima avaliados, a ACMG recomenda a atribuição de códigos que resultem na classificação das variantes em cinco categorias: patogênica; provavelmente patogênica; significado incerto; provavelmente benigna e benigna (91) (93).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características clínico-laboratoriais dos probandos

4.1.1 Diabetes neonatal

Foram selecionados 16 pacientes, dos quais metade são do sexo feminino. A mediana de idade ao diagnóstico de DMN foi de 5,5 meses de vida (do nascimento a 12 meses de vida). A mediana de idade atual é de 19 anos. Quatro dos 16 pacientes apresentaram DMNT, enquanto 12/16, DNMP. Todos os probandos com DMNP estão em insulino-terapia, um deles em transição para sulfonilureia após o resultado genético. Apenas 2/16 pacientes apresentaram anticorpos relacionados ao DM positivo, com suspeita clínica de Síndrome IPEX (do inglês: *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*). Dois probandos tiveram os autoanticorpos relacionados ao DM aferidos ao diagnóstico (com resultado negativo). A mediana de tempo entre o diagnóstico e a dosagem dos anticorpos foi de 14,5 anos (ao diagnóstico – 48 anos). As características clínico-laboratoriais dos probandos estão descritas na Tabela 3.

4.1.2 Síndrome de Wolfram

Foram estudados dois casos de pacientes com suspeita clínica de SW, do sexo feminino. A idade atual das pacientes é de 20 anos e 24 anos. Ambas apresentaram DM na primeira década de vida (aos 4 anos e 5 anos), além de surdez neurossensorial e déficit visual por atrofia do nervo óptico. As características clínico-laboratoriais estão descritas na Tabela 4.

4.1.3 Lipodistrofias hereditárias

4.1.3.1 Lipodistrofia congênita generalizada

Foram estudados 11 pacientes com suspeita clínica de LCG, apenas 1 do sexo masculino. A mediana de idade atual foi de 14 anos (1,2 a 42). Todos apresentavam perda generalizada de tecido adiposo subcutânea no primeiro ano de vida, além de hipertrofia muscular. P164, P781 e P1677 apresentavam, ainda, perda de gordura na palma das mãos e planta dos pés, que estavam preservadas nos outros casos. Sete dos 11 casos (7/11) eram de famílias consanguíneas, sendo que na P764 não foi possível identificar a consanguinidade, pois é adotiva.

Oito dos 11 (8/11) probandos apresentaram DM com uma mediana de idade de aparecimento de 15 anos (4 a 24). Cinco dos oito (5/8) pacientes com DM estavam em uso de insulina, quatro deles com doses altas. Todos possuíam hipertrigliceridemia. Apenas 3/11 não apresentaram alterações hepáticas ao USG. Três (3/11) tinham cardiomiopatia. Todos os pacientes em que a leptina foi dosada apresentaram hipoleptinemia. A DXA foi realizada em dois pacientes, P78 e P781, com porcentagem de gordura corporal total de 11,7% e 10,4%. As imagens encontram-se na Figura 6. As características clínicas das pacientes com suspeita clínica de LCG estão descritas na Tabela 5.

Figura 6 - Imagens da densitometria de corpo inteiro de pacientes com lipodistrofia congênita generalizada. A: P781; B: P78; C: controle. Nessa janela é possível a avaliação de gordura, representada pela cor amarela. Nota-se a presença de gordura uniformemente distribuída no controle, enquanto nos probandos P781 e P78 está ausente

4.1.3.2 Lipodistrofia parcial familiar

Foram estudados 13 pacientes com suspeita clínica de LPF. A mediana de idade atual foi de 48 anos (15 a 59). Onze dos 13 (11/13) probandos apresentaram DM, com uma mediana de idade de aparecimento de 37 anos (12 a 50). Seis dos pacientes com DM (6/13) estão em insulinoterapia. Apenas 1 paciente não possuía dislipidemia. Das pacientes cuja leptina foi dosada, apenas uma (P1797) apresentou resultado abaixo do valor de referência. As probandas P1850 e P1797 realizaram densitometria de corpo inteiro, com FMR de 1,80 e 1,40, respectivamente. As imagens encontram-se na Figura 7. As características clínicas das pacientes com fenótipo de LPF estão descritas na Tabela 6.

Figura 7 - Imagens da densitometria de corpo inteiro de pacientes com lipodistrofia parcial familiar. A: P1797; B: P1850; C: controle. Nessa janela é possível a avaliação de gordura, representada pela cor amarela. Nota-se a presença de gordura uniformemente distribuída no controle, enquanto nos probandos P1797 e P1850 há diminuição nos membros inferiores

Tabela 3 - Características clínico-laboratoriais dos probandos com suspeita de diabetes neonatal

P	Sexo	Idade atual (a)	Idade ao diagnóstico do DM (m)	Tratamento inicial	Tratamento atual	Tempo para remissão do DM (m)	Recorrência do DM/ tempo para recorrência (m)	Comorbidades	Ac relacionados ao DM	Tempo de dosagem dos Ac após o dg (a)
P351	M	27,6*	0,9	I	I	NA	NA	Infecções de repetição/ Diarreia Lesões de pele (na infância)	Positivo	22
P627	F	12*	0,3	I	I	NA	NA	Sd. West/ Déficit cognitivo	ND	ND
P1166	F	42,4	0,1	ADO	I	NA	NA	Obesidade	NR	NR
P1234	F	26,2	11	I	I	NA	NA	Ausente	Negativo	18
P1484	F	45,6	8	Nenhum	I	NA	NA	Hipotireoidismo/HAS/ DLP	Negativo	41
P90	M	54,5	12	I	I	NA	NA	HAS/ DLP/ Epilepsia	Negativo	48
P1779	M	1,5	1	I	I	NA	NA	Baixa estatura	Negativo	0
P1840	F	30	12	I	I	NA	NA	Ausente	Negativo	16
P1854	M	1,4	3	I	I	NA	NA	Ausentes	Negativo	0
P1865	F	2,2	9	I	I	NA	NA	Ausentes	Negativo	
P1884	F	7,3	7	I	I	NA	NA	Ausente	Negativo	5
P1894	M	26	4	I	Nenhum	4	Não	Sd. Ehler-Danlos tipo VII Litíase Renal/ Cisto renal único Malformações ureterais Déficit cognitivo	NR	18,5
P1912	F	7,9	12	I	Nenhum	48	Não	Epilepsia	Indeterminado	6
P1932	M	7	10	Nenhum	ADO		Sim/ 9	Estrabismo/Miopia Dentes de Hutchinson Eritema Idiopático	Negativo	4
P1959	M	4	0,2	I	Dieta	7	Não	Ausentes	Negativos	0
P2161	M	46	0	I	I	NA	NA	HAS/ Alopecia/ Neoplasia gástrica benigna	Positivo	43

DMN: diabetes neonatal; P: probandos. a: anos; m:meses; I: insulinoaterapia; ADO: antidiabético oral; DM: diabetes *mellitus*; Ac: pelo menos um anticorpo relacionado ao DM; ND: não disponível; dg: diagnóstico; NR: não realizado; Sd.: síndrome

*Falecidos

Tabela 4 - Características clínico-laboratoriais dos probandos com suspeita de Síndrome de Wolfram

P	Sexo	Idade atual (a)	Idade ao diagnóstico do DM (a)	Tratamento inicial	Tratamento atual	Comorbidades	Variação de HbA1C (%)	Peptídeo C
P769	F	24	5	I	I	Diabetes <i>insipidus</i> aos 7 a Déficit visual com atrofia do NO aos 7 anos	7,1 – 12,7	< 0,3
P1703	F	20	4	I	I	Surdez neurossensorial aos 8 anos Déficit visual com atrofia do NO aos 10 anos Diabetes <i>insipidus</i> aos 19 a Dilatação ureteral I e hidronefrose bilaterais aos 19 anos	7,7 – 8,5	< 0,3

P: probandos. a: anos; m: meses; I: insulinoterapia; DM: diabetes *mellitus*

Tabela 5 - Características clínico-laboratoriais dos probandos com suspeita de lipodistrofia congênita generalizada

P	Sexo	Idade atual (a)	Consanguinidade	TG (mg/dL) ¹	CT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Leptina (µg/L)	Esteatose hepática/ Hepatomegalia	ECO	DM	Idade ao diagnóstico do DM (a)	DTDI (UI/kg/dia)
P78	F	24.2	+	11828	1156	92	<0,78	+/+	Normal	+	15	2.1
P764	F	5.5	ND	427	162	21	<0,78	-/-	Normal	-	NA	NA
P1332	F	27.5	+	3625	644	55	<0,78	-/+	Normal	+	13	2.8
P1559	F	42*	ND	796	188	38	1,2	+/+	ND	+	24	ND
P1686	F	11	-	1686	165	28	NR	+/-	NR	+	9	Não está em uso - ADO
P1753	F	39.8	+	1959	265	22	<0,78	+/+	CHLV	+	15	6.8
P164	F	16.0	+	979	191	28	<0,78	-/+	CM	+	4	Não está em uso - ADO
P781	F	35.3	+	3024	444	42	<0,78	+/+	CHLV + SH	+	18	2.0
P1677	F	6.0	+	2501	240	NA	NR	-/-	Normal	-	NA	NA
P2267	M	17	-	61	122	45	NR	-/-	NR	+	NA	0,55
P2306	F	1,2	+	1086	171	8	NR	+/+	Normal	-	NA	NA

LCG: lipodistrofia congênita generalizada; P: probandos; ND: não disponível (paciente adotada); a: anos; TG: triglicérides; CT: colesterol total; ECO: ecocardiograma; +: presente; -: ausente; DM: diabetes *mellitus*; DTDI: dose total diária de insulina; ADO: antidiabético oral; NA: não aplicável; NR: não realizado CM: cardiomiopatia; HCVE: hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo; HS: hipertrofia septal ¹valores mais elevados ²descrito na literatura como 669insA (AF 05149)

*Falecida

Tabela 6 - Características clínico-laboratoriais dos probandos com suspeita clínica de lipodistrofia parcial familiar

P	Sexo	Idade atual (a)	Perda de gordura	Locais de acúmulo de gordura	Idade de início da perda de gordura	TG ¹ (mg/dL)	Leptina (ng/L)	Esteatose hepática/ Hepatomegalia	DM	Idade ao diagnóstico do DM (a)	T
P1420	F	58,5	Tronco, tórax e extremidades	Face e pescoço	2º. década de vida	262	15,9	+/-	+	50	ADO + I
P1574	F	54,5	Extremidades	Ausente	ND	257	NR	+/-	+	37	ADO + I
P1624	F	32,6	Extremidades	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	297	8,7	-/-	+	27	ADO + I
P1679	F	34	Tronco e tórax Extremidades	Face e pescoço	2ª. década de vida	890	NR	+/-	+	27	ADO
P1680	M	18	Extremidades inferiores	Face e pescoço, abdominal	1ª. década de vida	224	NR	+/+	+	12	ADO
P1681	F	58	Extremidades inferiores	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	333	NR	+/-	+	37	ADO + I
P1682	F	48	Extremidades superiores, Extremidades inferiores	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	519	NR	+/-	+	43	ADO
P1683	F	15	Extremidades	Face e pescoço	2ª. década de vida	126	NR	-/-	-	NA	NA
P1684	F	54	Extremidades superiores, Extremidades inferiores	Face e pescoço, abdominal	3ª. década de vida	360	NR	+/-	+	33	ADO + I
P1687	F	54	Extremidades inferiores	Abdominal	Após os 30 anos	4876	NR	+/-	+	42	ADO
P1797	F	48	Extremidades	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	221	2,1	+/+	+	47	ADO
P1850	F	31	Extremidades	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	470	NR		-	NA	NA
P1926	M	59	Extremidades	Face e pescoço	ND	912	NR	+/+	+	ND	I

LPF: lipodistrofia parcial familiar; P: probandos; ND: não disponível; a: anos; TG: triglicérides; +: presente; -: ausente; DM: diabetes mellitus; T: tratamento; ADO: antidiabético oral; I: insulina; NA: não aplicável;; NR: não realizado ¹valores mais elevados

4.2 Sequenciamento em larga escala

4.2.1 Métricas das corridas

A média da cobertura vertical das corridas variou de 49 x a 176 x, com 99% a 100% de cobertura das regiões codificadoras. A porcentagem de bases-alvo com, pelo menos, dez leituras foi de 95,5% a 100%. Os dados relacionados às métricas encontram-se no Anexo 4.

4.2.2 Variantes alélicas detectadas pelo painel

Dos 42 casos com suspeita clínica de diabetes monogênico raro, foram encontradas variantes alélicas candidatas em 23 (Figura 8). Os heredogramas dos probandos em que foram identificadas mutações encontram-se na Figura 9.

Figura 8 - Fluxograma dos casos analisados, demonstrando o número de variantes alélicas encontradas de acordo com cada fenótipo

Figura 9 A
Heredogramas dos casos de diabetes neonatal

Figura 9 B
Heredogramas dos casos de Síndrome de Wolfram

continua

Figura 9 C

N: alelo selvagem; M: alelo mutante; M/M': heterozigoto composto

Figura 9 - Heredogramas das famílias de probandos com suspeita de diabetes monogênico raros em que foram encontradas variantes alélicas candidatas. A: Heredogramas dos casos de diabetes neonatal. B: Heredogramas dos casos de Síndrome de Wolfram. C: Heredogramas dos casos de lipodistrofias hereditárias. As setas representam os probandos; o quadrado representa o sexo masculino e, o círculo, o sexo feminino. Os símbolos preenchidos em preto representam os indivíduos com fenótipo dos respectivos tipos de diabetes monogênico; o símbolo chamuscado representa um fenótipo mais leve de lipodistrofia; o símbolo com pontos o fenótipo de diabetes tipo 2

As variantes candidatas identificadas estão relacionadas na Tabela 7. Todos os transcritos referência relacionados aos genes estudados encontram-se no Anexo 3.

4.2.2.1 Diabetes neonatal

Seis de 16 pacientes com suspeita de DMN apresentaram variantes candidatas em genes compatíveis com o fenótipo. O resultado genético dos casos com suspeita clínica de DMN encontra-se na tabela 8.

O probando 351, com quadro clínico compatível com a Síndrome IPEX, apresentou uma variante *missense* no exon 12 do gene *FOXP3* (c.1190G>A / p.Arg397Gln) em hemizigose, já descrita em 2010 (94), classificada como patogênica.

Três probandos apresentaram variantes *missense* em heterozigose no gene *ABCC8* (c.4326G>C / p.Glu1442Asp; c.145A>T / p.Ile49Phe; c.970G>A / p.Val324Met). Duas foram classificadas como tendo significado incerto e uma como patogênica. Houve um caso de variante *missense* no *KCNJ11* (c.497G>A / p.Cys166Tyr), considerada patogênica.

O probando 1984, com fenótipo de DMNT, déficit cognitivo e malformações ureterais, apresentou uma variante *missense* em homozigose no *ZFP57* (c.112C>T / p.Arg38Trp), não descrita na literatura, classificada como significado incerto.

4.2.2.2 Síndrome de Wolfram

Ambos os casos analisados apresentaram variantes candidatas compatíveis com o fenótipo (Tabela 8).

Foram encontradas três variantes nas duas pacientes, que as apresentaram em heterozigose composta: uma *missense*, uma *nonsense* e uma *frameshift* (c.1145T>C / p.Leu382Pro; c.1941C>A / p.Cys647*; c.1228_1231del / p.Val412SerfsX29). Todas foram descritas na literatura,

também em heterozigose composta, associadas a casos típicos de SW (95) (96) (97).

4.2.2.3 Lipodistrofias hereditárias

Vinte e quatro pacientes com suspeita clínica de lipodistrofia hereditária foram estudados, dos quais 15 apresentaram alterações em genes candidatos (tabela 9).

4.2.2.3.1 Lipodistrofia congênita generalizada

Das 10 variantes candidatas encontradas nos 11 casos com suspeita clínica de LCG (Tabela 4), 3 foram no *AGPAT2*. Foram localizadas variantes *nonsense* (c.646A>T / p.Lys216*), alteração no sítio de *splicing* (c.589-2A>G / p.Gln196fs * 228) e uma grande deleção (c.366_588+534del / p.Gly106fs*188) (Figura 10). Todas foram previamente relatadas (49,98). De acordo com os critérios da ACMG, são classificadas como patogênicas.

Figura 10 - Deleção do exon 3 e parte do exon 4 do *AGPAT2*. a) Gráfico do CONTRA– razão logarítmico *versus* posição genômica mostrando a deleção (seta). b) Imagem da deleção no IGV, comparando o probando P1332 e controle

Em 4 desses pacientes, identificaram-se variantes no gene *BSCL2*, que resultaram em codón de parada prematuro. Uma *nonsense* (c.412C>T / p.Arg138 *), duas *frameshift indel* (c.192_193delCCinsGGA / p.Ser64Argfs * 12 e c.222_223del / p.Cys74fs), uma duplicação da adenina levando a uma *frameshift* (c.325dupA / P.Thr109Asnfs * 5) e uma alteração em sítio de *splicing* (IVS2 c.213 -11A>G / g.7286A>G). Apenas uma não foi descrita na literatura (50,99). Todas foram classificadas como patogênicas.

Duas probandas com suspeita de LCG apresentaram variantes no *LMNA* (c.29C>T / p.Ter10Ile e c.1744C>T / p.Arg582Cys), descritas previamente (58,100).

4.2.2.3.2 Lipodistrofia parcial familiar

Dos 13 probandos com suspeita clínica de LPF, 4 apresentaram variantes em genes candidatos compatíveis com o fenótipo (tabela 10).

Foram encontradas variantes *missense* nos genes *LMNA*, *AKT2* e *PPARG*. Uma variante encontrada no *LMNA* e outra no *AKT2* não foram previamente descritas e, de acordo com os critérios do ACMG, são classificadas como tendo significado incerto. Por outro lado, a variante no *PPARG* relatada previamente em uma família, foi classificada como provavelmente patogênica. A filha da probanda P1797, portadora da mutação no *PPARG*, também com fenótipo de LPF, apresentou a mesma variante.

A probanda 1559, com quadro de perda generalizada de gordura desde o nascimento, apresentou uma variante no *LMNA* (p.Arg582Cys) em homozigose. Na segregação familiar, evidenciou-se que as duas filhas, ambas com quadro de LPF, também são homozigotas para a variante, sendo que apresentam grave perda parcial de gordura com início mais tardio que a da mãe. O marido da probanda e pai das meninas (casamento consanguíneo), aparentemente sem aspecto físico de perda de gordura, bem como sem distúrbios metabólicos, apresentou a variante em heterozigose. A avaliação física possui distribuição normal da gordura

corporal sem distúrbios metabólicos, porém foi realizada ressonância nuclear magnética que evidenciou perda parcial de gordura subcutânea (101).

Tabela 7 - Variantes alélicas candidatas encontradas no SLE de pacientes com suspeita clínica de diabetes monogênico

Probando(s)	Gene	Variante	Alteração proteica	Estado	Classificação ACMG	Referências
Diabetes neonatal						
P351	<i>FOXP3</i>	c.1190G>A	p.Arg397G	HEM	P	(94)
P627	<i>KCNJ11</i>	c.497G>A	p.Cys166Tyr	HET	P	(102)
P1234	ABCC8	c.4326G>C	/ p.Glu1442Asp	HET	VSI	ND
P1854	<i>ABCC8</i>	c.145A>T	p.Ile49Phe	HET	PP	(103)
P1959	<i>ABCC8</i>	c.970G>A	p.Val324Met	HET	PP	(104)
P1894	ZFP57	c.112C>T	p.Arg38Trp	HO	VSI	ND
Síndrome de Wolfram						
P769	<i>WFS1</i>	c.1145T>C	p.Leu382Pro	HETC	P	(95)
	<i>WFS1</i>	c.1228_1231del	Val412SerfsX29	HETC	P	(96)
P1703	<i>WFS1</i>	c.1228_1231del	Val412SerfsX29	HETC	P	(96)
	<i>WFS1</i>	c.1941C>A	p.Cys647Ter	HETC	P	(95)
Lipodistrofias hereditárias						
P78	<i>AGPAT2</i>	c.646A>T	p.Lys216*	HO	P	(98)
P1332	<i>AGPAT2</i>	c.589-2A>G	p.Gln196fs * 228	HO	P	(49)
P764, P1753 e P2267	<i>AGPAT2</i>	c.366_588+534 del	p.Gly106fs*188	HO	P	(49)
P164	<i>BSCL2</i>	c.412C>T	p.Arg138*	HO	P	(50)
P781	<i>BSCL2</i>	c.192_193delC CinsGGA	p.Ser64Argfs *12	HO	P	(50)
P1677	<i>BSCL2</i>	c.325dupA	p.Thr109Asnfs *5	HO	P	(50)
P2306	BSCL2	c.222_223del	p.Cys74fs	HETC	P	ND
P2306	<i>BSCL2</i>	c.213-11A>G	g.7286A>G	HETC	P	(99)
P1559	<i>LMNA</i>	c.1744C>T	p.Arg582Cys	HO e HETC	P	(58)
P1679	LMNA	c.23G>A	p.Arg8His	HETC	VSI	ND
	<i>LMNA</i>	c.1744C>T	p.Arg582Cys	HETC	P	(58)
P1683	<i>LMNA</i>	c.1396A>G	p.Asn466Asp	HET/ Digênica	P	(58)
	AKT2	c.782C>T	p.Ser261Leu	HET/ Digênica	SI	ND
P1686	<i>LMNA</i>	c.29C>T	p.Ter10Ile	HET	P	(100)
P1797	<i>PPARG</i>	c.952G>A	p.Val318Met	HET	P	(105)
P1850	<i>LMNA</i>	c.1444C>T	p.R482W	HET	PP	(71)

DMN: diabetes neonatal; SW: Síndrome de Wolfram; LCG: lipodistrofia congênita generalizada; LPF: lipodistrofia parcial familiar; HEM: hemizigose; HET: heterozigose; HO: homozigose; HETC: heterozigose composta; P: patogênica; PP: provavelmente patogênica; VSI: variante de significado incerto. ND: não descrita. Em negrito as variantes não descritas previamente.

Tabela 8 – Características clínico-laboratoriais e diagnóstico genético dos probandos com suspeita clínica de diabetes neonatal

P	Sexo	Idade atual (a)	Idade ao diagnóstico do DM (m)	Tratamento inicial	Tratamento atual	Tempo para remissão do DM (m)	Recorrência do DM/ tempo para recorrência (m)	Comorbidades	Ac relacionados ao DM	Tempo de dosagem dos Ac após o dg (a)	Diagnóstico genético	Referências
P351	M	27,6*	0,9	I	I	NA	NA	Infecções de repetição/ Lesões de pele (na infância)	Positivo	22	<i>FOXP3</i> : c.1190G>A	(94)
P627	F	12*	0,3	I	I	NA	NA	Sd. West/ Déficit cognitivo	ND	ND	<i>KCNJ11</i> : c.497G>A	(102)
P1166	F	42,4	0,1	ADO	I	NA	NA	Obesidade	NR	NR	Negativo	-
P1234	F	26,2	11	I	I	NA	NA	Ausente	Negativo	18	<i>ABCC8</i>: c.4326G>C	ND
P1484	F	45,6	8	Nenhum	I	NA	NA	Hipotireoidismo/HAS/ DLP	Negativo	41	Negativo	-
P90	M	54,5	12	I	I	NA	NA	HAS/ DLP/ Epilepsia	Negativo	48	Negativo	-
P1779	M	1,5	1	I	I	NA	NA	Baixa estatura	Negativo	0	Negativo	-
P1840	F	30	12	I	I	NA	NA	Ausente	Negativo	16	Negativo	-
P1854	M	1,4	3	I	I	NA	NA	Ausentes	Negativo	0	<i>ABCC8</i> : c.145A>T	(103)
P1865	F	2,2	9	I	I	NA	NA	Ausentes	Negativo		Negativo	-
P1884	F	7,3	7	I	I	NA	NA	Ausente	Negativo	5	Negativo	-
P1894	M	26	4	I	Nenhum	4	Não	Sd. Ehler-Danlos tipo VII Litíase Renal/ Cisto renal único Malformações ureterais Déficit cognitivo	NR	18,5	<i>ZFP57</i>: c.112C>T	ND
P1912	F	7,9	12	I	Nenhum	48	Não	Epilepsia	Indeterminado	6	Negativo	-
P1932	M	7	10	Nenhum	ADO		Sim/ 9	Estrabismo/Miopia Dentes de Hutchinson Eritema Idiopático	Negativo	4	Negativo	-
P1959	M	4	0,2	I	Dieta	7	Não	Ausentes	Negativos	0	<i>ABCC8</i> : c.970G>A	(104)
P2161	M	46	0	I	I	NA	NA	HAS/ Alopécia/ Neoplasia gástrica benigna	Positivo	43	Negativo	-

DMN: diabetes neonatal; P: probandos. a: anos; m: meses; I: insulinoterapia; ADO: antidiabético oral; DM: diabetes *mellitus*; Ac: pelo menos um anticorpo relacionado ao DM; ND: não disponível; dg: diagnóstico; NR: não realizado; Sd.: síndrome; ND: não descrita. Em negrito as variantes não descritas previamente.

*Falecidos

Tabela 9 - Características clínico-laboratoriais e diagnóstico genético dos probandos com suspeita de Síndrome de Wolfram

P	Sexo	Idade atual (a)	Idade ao diagnóstico do DM (a)	Tratamento inicial	Tratamento atual	Comorbidades	Variação de HbA1C (%)	Peptídeo C	Diagnóstico genético	Referências
P769	F	24	5	I	I	Diabetes <i>insipidus</i> aos 7 a Déficit visual com atrofia do NO aos 7 anos	7,1 – 12,7	< 0,3	WFS1: c.1145T>C + c.1228_123 1del	(95) (96)
P1703	F	20	4	I	I	Surdez neurossensorial aos 8 anos Déficit visual com atrofia do NO aos 10 anos Diabetes <i>insipidus</i> aos 19 a Dilatação ureteral I e hidronefrose bilaterais aos 19 anos	7,7 – 8,5	< 0,3	WFS1: c.1941C>A + c.1228_123 1del	(95) (96)

P: probandos. a: anos; m: meses; I: insulinoterapia; DM: diabetes *mellitus*

Tabela 10 - Características clínico-laboratoriais e diagnóstico genético dos probandos com suspeita de lipodistrofia congênita generalizada

P	Sexo	Idade atual (a)	Consanguinidade	TG (mg/dL) ¹	CT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Leptina (µg/L)	Esteatose hepática/ Hepatomegalia	ECO	DM	Idade ao diagnóstico do DM (a)	DTDI (UI/kg/dia)	Diagnóstico genético	Referências
P78	F	24.2	+	11828	1156	92	<0,78	+/+	Normal	+	15	2.1	AGPAT2: c.646A>T	(98)
P764	F	5.5	ND	427	162	21	<0,78	-/-	Normal	-	NA	NA	AGPAT2: c.366_588+534del	(49)
P1332	F	27.5	+	3625	644	55	<0,78	-/+	Normal	+	13	2.8	AGPAT2: c.589-2A>G	(49)
P1559	F	42*	ND	796	188	38	1,2	+/+	ND	+	24	ND	LMNA: c.C1744C>T	(58)
P1686	F	11	-	1686	165	28	NR	+/-	NR	+	9	Não está em uso - ADO	LMNA: c.29C>T	(100)
P1753	F	39.8	+	1959	265	22	<0,78	+/+	CHLV	+	15	6.8	AGPAT2: c.366_588+534del	(49)
P164	F	16.0	+	979	191	28	<0,78	-/+	CM	+	4	Não está em uso - ADO	BSCL2: c.412C>T	(50)
P781	F	35.3	+	3024	444	42	<0,78	+/+	CHLV + SH	+	18	2.0	BSCL2: c.192_193delCCinsGGA	(50)
P1677	F	6.0	+	2501	240	NA	NR	-/-	Normal	-	NA	NA	BSCL2: c.325dupA ²	(50)
P2267	M	17	-	61	122	45	NR	-/-	NR	+	NA	0,55	AGPAT2: c.366_588+534del	(49)
P2306	F	1,2	+	1086	171	8	NR	+/+	Normal	-	NA	NA	BSCL2: c.213-11A>G+ c.222_223del	(99) NDes

LCG: lipodistrofia congênita generalizada; P: probandos; ND: não disponível (paciente adotada); a: anos; TG: triglicérides; CT: colesterol total; ECO: ecocardiograma; +: presente; -: ausente; DM: diabetes *mellitus*; DTDI: dose total diária de insulina; ADO: antidiabético oral; NA: não aplicável; NR: não realizado CM: cardiomiopatia; HCVE: hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo; HS: hipertrofia septal; NDes: não descrita. Em negrito as variantes não descritas previamente. ¹valores mais elevados ²descrito na literatura como 669insA (AF 05149)
*Falecida

Tabela 11 - Características clínico-laboratoriais e diagnóstico genético dos probandos com suspeita clínica de lipodistrofia parcial familiar

P	Sexo	Idade atual (a)	Perda de gordura	Locais de acúmulo de gordura	Idade de início da perda de gordura	TG ¹ (mg/dL)	Leptina (ng/L)	Esteatose hepática/Hepatomegalia	DM	Idade ao diagnóstico do DM (a)	T	Diagnóstico genético	Referências
P1420	F	58,5	Tronco, tórax e extremidades	Face e pescoço	2ª. década de vida	262	15,9	+/-	+	50	ADO + I	Negativo	-
P1574	F	54,5	Extremidades	Ausente	ND	257	NR	+/-	+	37	ADO + I	Negativo	-
P1624	F	32,6	Extremidades	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	297	8,7	-/-	+	27	ADO + I	Negativo	-
P1679	F	34	Tronco e tórax Extremidades	Face e pescoço	2ª. década de vida	890	NR	+/-	+	27	ADO	<i>LMNA</i> : c.23G>A + c.1744C>T	NDes (58)
P1680	M	18	Extremidades inferiores	Face e pescoço, abdominal	1ª. década de vida	224	NR	+/+	+	12	ADO	Negativo	-
P1681	F	58	Extremidades inferiores	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	333	NR	+/-	+	37	ADO + I	Negativo	-
P1682	F	48	Extremidades superiores, Extremidades inferiores	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	519	NR	+/-	+	43	ADO	Negativo	-
P1683	F	15	Extremidades	Face e pescoço	2ª. década de vida	126	NR	-/-	-	NA	NA	<i>LMNA</i> : c.1396A>G + <i>AKT2</i>: c.782C>T	(58) NDes
P1684	F	54	Extremidades superiores, Extremidades inferiores	Face e pescoço, abdominal	3ª. década de vida	360	NR	+/-	+	33	ADO + I	Negativo	-
P1687	F	54	Extremidades inferiores	Abdominal	Após os 30 anos	4876	NR	+/-	+	42	ADO	Negativo	-
P1797	F	48	Extremidades	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	221	2,1	+/+	+	47	ADO	<i>PPARG</i> : c.952G>A	(105)
P1850	F	31	Extremidades	Face e pescoço, abdominal	2ª. década de vida	470	NR	-	-	NA	NA	<i>LMNA</i> : c.1444C>T	(71)
P1926	M	59	Extremidades	Face e pescoço	ND	912	NR	+/+	+	ND	I	Negativo	-

LPF: lipodistrofia parcial familiar; P: probandos; ND: não disponível; a: anos; TG: triglicérides; +: presente; -: ausente; DM: diabetes mellitus; T: tratamento; ADO: antidiabético oral; I: insulina; NA: não aplicável; NR: não realizado; NDes: não descrita. Em negrito as variantes não descritas previamente ¹valores mais elevados

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Sequenciamento em larga escala

5.1.1 Métricas das corridas

As métricas obtidas demonstram uma qualidade apropriada do sequenciamento em larga escala do presente estudo. Pode-se considerar uma cobertura vertical (*read depth*) maior que 20 x como adequada para afastar erros de alinhamento e chamadas de variantes (90). Além disso, uma porcentagem de 80% de bases-alvo com pelo menos dez leituras é considerada satisfatória (106). A variação de *reads* válidos por pacientes pode diferir de acordo com o número de pacientes estudados por corrida. Além disso, o painel passou por atualização, uma segunda versão com aumento das regiões-alvo, justificando a quantidade de dados gerados para cada paciente.

5.1.2 Variantes candidatas detectadas

5.1.2.1 Diabetes neonatal

Variante no *FOXP3* (c.1190G>A / p.Arg397Gln)

O *FOXP3*, que está localizado no braço curto do cromossomo X, consiste de 12 exons e codifica um fator de transcrição, também denominado FOXP3, fundamental para o desenvolvimento e função adequada das células T regulatórias (107).

R397 é um resíduo conservado necessário para a função proteica (108). Encontra-se no domínio *forkhead*, também conhecido como hélice alada (Figura 11), que se liga ao DNA em seu esqueleto de açúcar-fosfato.

As células T regulatórias mantêm a tolerância periférica ao suprimirem as células T autorreativas (109). Assim, o FOXP3 é um mediador crítico para a manutenção da autotolerância e homeostase imune, além do controle da resposta inflamatória (110).

*: *Loci* associados com mutações causadoras de doenças.

Seta: local da variante c.1190G>A / p.Arg397Gln

Fonte: Adaptada de (111)

Figura 11 - Estrutura e organização do gene *FOXP3* humano. Preto: exon - 1, parte da região 5'UTR; branco: 3' UTR; cinza: regiões não codantes; azul: regiões codantes não incluídas nos domínios funcionais. As regiões de outras cores no gene correspondem aos domínios nomeados

Atualmente, mais de 70 variantes foram descritas no FOXP3 como causadoras da Síndrome IPEX. Esta é uma síndrome ligada ao X, caracterizada por desregulação autoimune que cursa com poliendocrinopatia e enteropatia. É responsável por 4% dos diagnósticos de DMN nos pacientes do sexo masculino. Não existe uma correlação genótipo-fenótipo bem estabelecida, já que a mesma variante pode levar a fenótipos distintos. Além do probando em questão, a variante p.Arg397Gln foi descrita em outros três pacientes: um garoto de 4 anos de idade com sintomas clássicos da síndrome, como DM1, enteropatia e acometimento de pele (94); um caso com 1 mês de vida que apresentou diarreia, desidratação hiponatrêmica e dermatite; e, finalmente, outro paciente com diarreia intratável e infecções recorrentes. Destaca-se o fato de o probando em questão, em nossa

casuística, apresentar maior expectativa de vida quando comparado aos casos de Síndrome IPEX previamente reportados, que apresentam uma mortalidade de 34% com 10 anos de vida, e apenas 3/134 casos descritos com idade superior a 20 anos (112).

Variantes nos genes codificadores dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) das células betapancreáticas – *KCNJ11* e *ABCC8* (c.G497A:p.C166Y e c.4326G>C/ p.Glu1442Asp; c.145A>T / p.I49F; c.G970A:p.V324M)

Os K_{ATP} são estruturas octaméricas formadas por quatro poros que os retificam – subunidades KIR6.2 - e quatro unidades reguladoras do receptor de sulfonilureia 1 – SUR1.

A entrada da glicose na célula betapancreática ocorre pelo transportador GLUT2, sendo em seguida fosforilada pela glicoquinase e metabolizada, produzindo ATP. O ATP se liga às subunidades KIR 6.2, fechando os K_{ATP} e induzindo a atividade dos canais pela interação com SUR1 pelos nucleotídeos de magnésio. O fechamento dos canais leva à despolarização da membrana e ativação dos canais de cálcio, aumentando a concentração intracelular desse íon e desencadeando a exocitose de insulina (113).

Além de expressas nas células betapancreáticas, ambas as subunidades dos K_{ATP} são expressas no cérebro, por isso os pacientes que apresentam DMN decorrente de mutações nos K_{ATP} podem apresentar sintomas neurológicos.

A Figura 12 representa esquematicamente os genes *KCNJ11* e *ABCC8*, bem como suas respectivas proteínas e o K_{ATP} .

Fonte: Adaptado de (114)

N: região amino-terminal; C: região carboxi-terminal; NBD1: domínio de ligação ao nucleotídeo 1; NBD2: domínio de ligação ao nucleotídeo 2; A: motivo Walker A; B: motivo Walker B

Figura 12 - Representação esquemática dos genes *KCNJ11* e *ABCC8*, suas respectivas proteínas e o canal de potássio ATP-dependente (K_{ATP}). Os genes *KCNJ11* e *ABCC8* estão localizados no cromossomo 11. O *KCNJ11* codifica a proteína Kir6.2 e o *ABCC8* a proteína SUR1. Ambas são subunidades dos K_{ATP}. O metabolismo da glicose pode afetar a concentração celular de ATP e, consequentemente, a função do canal

O gene *KCNJ11* está localizado no cromossomo 11p15.1, mesma localização do gene *ABCC8*, e é composto de um único exon que codifica 390 aminoácidos. O gene *KCNJ11* codifica o Kir6.2, que permite a entrada de potássio nas células betapancreáticas. Suas mutações são a causa mais comum de DMNP (30% a 34%), tanto DMNP quanto DMNT, porém mais frequentemente DMNP (3,5). A paciente em questão, P627, apresentou um caso típico de DMNP associado à Síndrome de DEND, com epilepsia

(Síndrome de West) e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, assim como outros casos com a mesma variante (102). A probanda faleceu aos 12 anos por complicações relacionadas a um quadro de pneumonia. Flanagan *et al.* demonstraram que resíduos relacionados com um fenótipo mais grave, como o caso em questão, frequentemente se localizam distantes do sítio de ligação ao ATP ou do domínio formador do poro. Essas mutações levam à diminuição da sensibilidade dos K_{ATP} , reduzindo a habilidade do canal em fechar em resposta a níveis elevados de ATP. As mutações como a Cys166Tyr, que estão associadas à DEND, mostram uma redução mais profunda na resposta ao ATP; da mesma forma, as variantes relacionadas ao DMNP (104).

O gene *ABCC8*, composto por 39 exons, codifica o SUR1, que tem como função regular os K_{ATP} e, consequentemente, a liberação de insulina (114). As variantes no *ABCC8* são responsáveis por 11% dos casos de DMN em famílias não consanguíneas (7), mais frequentemente DMNT. Apesar de a maioria dos casos apresentarem DMN antes dos primeiros 6 meses de vida, há relatos de apresentações mais tardias, como no caso da probanda P1.234. Mais que 90% dessas alterações obtêm bom controle glicêmico à introdução de sulfonilureia. No caso de P1.234, foi tentada a transição, porém sem sucesso. Isso pode se justificar pelo fato de ter sido tardia (vinte e quatro anos após o diagnóstico). O probando P1.854 está em transição de insulinoterapia para tratamento com sulfonilureia; por outro lado, o probando 1.959 teve DMNT. As variantes no *ABCC8* podem causar tanto DMNP quanto DMNT, embora o último seja mais frequente (7).

Variantes no *ZFP57* (c.112C>T:p.Arg38Trp)

Algumas alterações epigenéticas podem levar ao DMN. Uma pequena porção do genoma humano é composta por genes *imprimados*, em que um dos alelos só é expresso quando herdado de um dos genitores (Figura 13). O DMNT pode ser causado pela superexpressão de genes com tais características, como *PLAGL1* e *HYMAI*, pertencentes ao *locus* 6q24. Outras

alterações podem afetar mais *loci*, denominadas de hipometilação de múltiplas regiões *imprintadas*, podendo resultar em DMNT. Tais indivíduos apresentam uma completa perda de metilação da região materna denominada DMR, associada ao DMN, além de alterações de metilação em outras regiões. Mais da metade desses casos apresentam variantes em homozigose ou heterozigose composta no *ZFP57*, que desempenha um papel na manutenção do *imprinting*, preservando a metilação nas regiões *imprintadas* em estágios iniciais do desenvolvimento (11). A variante candidata encontrada no probando 1984 (c.112C>T:p.Arg38Trp) está registrada no CLINVAR também com significado incerto, associada ao quadro clínico de DMNT, sem outras características especificadas. Mais estudos seriam necessários para avaliar a patogenicidade dessa variante.

Fonte: Adaptado de (115)

Figura 13 - Alterações epigenéticas que podem levar ao DMN, destacando-se com a seta as mutações no *ZFP57*

O presente estudo apresentou baixa positividade quando comparado a outros que investigaram DMN por SEL, que permitem o diagnóstico genético em aproximadamente 80% (116). Sabe-se que, a partir de 6 meses, o número de casos de DM 1 se sobrepõe aos de DMN (7,10). Em nossa análise, ao separarmos os casos com diagnóstico antes dos 6 meses, houve maior índice de positividade (5/8) quando comparados àqueles em que ocorreu entre 6 meses e 12 meses (1/8), corroborando com os achados da literatura. Um diferencial para a triagem seria a dosagem de anticorpos relacionados ao DM. Entretanto, a probabilidade de estarem negativos é proporcional ao tempo de dosagem após o diagnóstico (117,118). Quando se trata de anticorpos anticélulas betapancreáticas, estão presentes em 70% a 80% dos pacientes com DM1, mas tendem a desaparecer entre dois anos e três anos de evolução da doença (117). No caso dos anticorpos anti-GAD, estão presentes em 80% dos casos de DM1 ao diagnóstico e, após dez anos de evolução, podem ser positivos em 50% dos casos (117). Nesse trabalho, a mediana de tempo entre o diagnóstico e a dosagem dos anticorpos foi de 16 anos (ao diagnóstico – 43 anos), não sendo, portanto, uma triagem efetiva.

5.1.2.2 Síndrome de Wolfram (p.Leu382Pro, Val412SerfsX29 e p.Cys647Ter)

Noventa por cento dos casos de Síndrome de Wolfram são causados por mutações no *WFS1*.

O *WFS1* consiste de 8 exons e codifica uma glicoproteína transmembrana com três domínios estruturais: uma porção central hidrofóbica de 350 resíduos com 9 segmentos transmembrana; uma região amino-terminal extracitoplasmática de aproximadamente 300 resíduos e uma região carboxi-terminal intracitoplasmática de aproximadamente 240 resíduos (34,119,120). Localiza-se no retículo endoplasmático, sendo que a porção amino-terminal está no citoplasma, enquanto a carboxi-terminal está no lúmen do retículo (Figura 14). As três variantes encontradas localizam-se

nos domínios transmembrana do *WFS1*. Hardy *et al.* analisaram seus resultados de 30 pacientes com SW com os de outros dois estudos, relacionando a frequência de mutações com os resíduos proteicos. Verificaram que a maioria está localizada nos sítios transmembrana da proteína, assim como encontramos em nosso estudo (119).

Fonte: Adaptado de (121)

Aa: aminoácidos; RE: retículo endoplasmático; N: região amino-terminal; C: região carboxi-terminal; setas: local das variantes encontradas (p.Leu382Pro, Val412SerfsX29 e p.Cys647Ter)

Figura 14 - Estrutura hipotética da proteína wolframina com a localização das variantes encontradas nesse estudo

Além disso, a literatura refere a maioria dos casos com heterozigose composta para duas variantes diferentes (119), sendo o exon 8 um *hotspot*, apresentando grande parte das variantes.

A probanda 769 apresentou duas variantes em heterozigose composta, ambas no exon 8: uma *missense* e uma *frameshift* (c.1145T>C / p.Leu382Pro + c.1228_1231del / p.Val412SerfsX29). A paciente descrita na literatura como portadora da primeira variante teve DM aos 6 anos, evoluindo com atrofia óptica, diabetes insípido e surdez na segunda década de vida, além de anormalidades do trato urinário (95). A variante c.1228_1231del, uma deleção de 4-bp, resulta em um códon de parada prematuro, acarretando uma proteína truncada. Foi descrita inicialmente em famílias italianas, cujo fenótipo incluía DM entre 10 anos e 12 anos, surdez neurossensorial, anormalidades do trato urinário (96). No caso apresentado

nesse estudo, a probanda apresentou DM na primeira década de vida e atrofia óptica sem surdez neurosensorial.

A probanda 1703 também apresentou duas variantes em heterozigose composta, também no exon 8: uma *nonsense* e outra em *frameshift*, (c.1941C>A / p.Cys647* + c.1228_1231del / p.Val412SerfsX29, a última encontrada também na probanda 769 e discutida anteriormente (96). A variante c.1941C>A foi descrita, em 2002, em um menino brasileiro que apresentou DM aos 4 anos e atrofia do nervo óptico aos 11 anos (97). A paciente em questão também apresentou DM aos 4 anos e atrofia de nervo óptico aos 10 anos, porém, ao longo da vida evoluiu com outras comorbidades associadas ao fenótipo.

5.1.2.3 Lipodistrofias hereditárias

Variantes no *AGPAT2* e *BSCL2*

O *AGPAT2* tem papel fundamental na formação dos adipócitos, sendo expresso abundantemente no tecido adiposo, com papel de catalisar a acilação do ácido lisofosfatídico para formar ácido fosfatídico, um intermediário na biossíntese do triacilglicerol e glicerofosfolipídios (49). Assim, mutações no *AGPAT2* não permitem a formação adequada da gota lipídica, levando à ausência de tecido adiposo. A proteína *AGPAT2*, bem como o local das variantes encontradas nesse estudo estão representadas na Figura 15.

Fonte: Adaptada de (122)

Figura 15 - Representação esquemática do gene *AGPAT2* e sua proteína, com a localização das variantes encontradas nesse estudo. Exons numerados de 1 a 6, com suas respectivas regiões codificadas representadas com a mesma cor

P764, P1753 e P2267 tiveram grande deleção em homozigose no exon 3 e parte do exon 4 (c.366_588+534del/ p.Gly106fs*188). Essa deleção nos exons 3 e 4, previamente reportada por Agarwal (49) numa família de origem portuguesa e identificada em outras famílias da mesma descendência (98), foi descrita na região Sudeste do Brasil com alta prevalência (123–125).

O *BSCL2* é responsável pela codificação da seipina, proteína que participa da formação da gota lipídica e diferenciação do adipócito. Além disso, é uma proteína transmembrana que se localiza no retículo endoplasmático com função na fusão das vesículas lipídicas para a formação da gota (39). A representação esquemática do *BSCL2*, bem como da seipina e da localização das variantes encontradas nesse estudo encontram-se na Figura 16.

Fonte: Adaptada de (126)

Figura 16 - Representação esquemática do *BSCL2* e da seipina. As cores da representação do gene correspondem às porções codificadas na proteína. Em verde, domínios transmembrana. Todas as variantes encontradas nesse estudo localizam-se na alça conservada (*)

No Brasil, a presença da variante c.325dupA / P.Thr109Asnfs* no *BSCL2*, também conhecida como 669insA, foi reportada em famílias da mesma região do Nordeste (124,125), descritas anteriormente em pacientes de ascendência portuguesa na África do Sul (50) e Canadá (78), sugerindo um efeito fundador (129). Na nossa casuística encontramos apenas um caso em que ocorreu essa mutação.

Apesar de outra mutação menos prevalente ter sido relatada em nosso país no *CAV1* (52,54), as alterações no *AGPAT2* e *BSCL2* correspondem à quase totalidade dos casos brasileiros descritos. Questiona-se, porém, se a pesquisa genética dos pacientes com suspeita clínica deve ser diretamente direcionada para os dois sítios mais frequentes de alterações no *AGPAT2* e *BSCL2*, p.Gly106fs*188 e p.Thr109Asnfs*, já que, em nosso estudo corresponderam a apenas 4 das 10 variantes encontradas, demonstrando a importância de estudar os dois genes por inteiro. Existe uma diferença clínica sutil entre os pacientes com LCG-1 e LCG-2. No primeiro caso existe a ausência de tecido adiposo na maioria das áreas subcutâneas, regiões intra-abdominal e intratorácica, além da medula óssea.

Entretanto, ocorre a preservação da gordura nas palmas e plantas, escalpo, órbita, regiões peri-articulares, períneo, vulva e região pericalicial. A preservação da gordura mecânica pode ocorrer pois existem 12 isoformas do AGPAT expressas no tecido adiposo e, apesar de a AGPAT2 ser a mais ativa nesse tecido, ocorre também a expressão das outras isoformas. Por outro lado, quando há ausência do BSCL2, o tecido adiposo fica totalmente ausente. Essa diferença clínica pode direcionar a pesquisa genética por Sanger. Em um centro de pesquisa de diabetes genético como o nosso, porém, a utilização de um painel de SLE mostra benefícios (128).

Variantes no *LMNA* (p.Arg8His; p.Ter10Ile; p.Arg582Cys; p.Asn466Asp

O gene *LMNA* codifica as laminas tipo A e C, importantes na composição da membrana nuclear, na organização da cromatina, conexão entre núcleo e citoplasma, transcrição gênica e mitoses. Alterações na *LMNA* são associadas a diversas doenças, chamadas laminopatias. Dentre elas estão as LPF, causadas na maior parte por alterações no *LMNA*, mais comumente em heterozigose, que podem, a despeito de possuírem a mesma variante, apresentar variabilidade fenotípica.

O *LMNA* pode ser dividido em duas regiões baseadas no sinal de localização nuclear (SLN), que se inicia no resíduo 416 até o 423, onde não foram descritas mutações até o momento. A região acima do SLN codifica a haste central em hélice, enquanto a região abaixo codifica a cauda. O fenótipo das laminopatias está associado à posição da variante. Mutações relacionadas à LPF estão localizadas à jusante do SLN, no domínio carboxi-terminal da lamina A/C. Nesses casos, não ocorre ruptura da proteína, mas alteração da carga positiva da região afetada, afetando a interação da lamina A/C com fatores de transcrição e reguladores (129).

A fim de relacionar o tipo de laminopatia com a região do *LMNA* em que se encontram mutações, Hegele *et al.* agruparam as mutações de acordo com o tipo de doença ao longo do *LMNA*. Concluíram que todas as variantes causadoras de LPF encontram-se abaixo do SLN (130). Nesse

estudo, cinco pacientes apresentaram variantes candidatas no *LMNA*, sendo a maioria localizada abaixo do SLN, como referido na literatura.

Uma exceção é a variante p.Arg8His, classificada como tendo significado incerto. Acreditamos que não tenha correlação ao fenótipo, pois encontra-se na região da cabeça da lamina A/C, que não se associa com quadros de LPF (130). Além disso, a mesma probanda, 1679, possui outra variante no exon 11, classificada como patogênica (c.1.744C>T:p.Arg582Cys), que justifica o fenótipo. A representação esquemática do *LMNA*, bem como a localização das variantes encontradas nesse estudo estão na Figura 17.

Fonte: Adaptado de (58)
SLN: sinal de localização nuclear.

Figura 17 - Representação esquemática do *LMNA* com a localização das variantes encontradas nesse estudo. As cores da representação do gene correspondem às porções codificadas na proteína.

A paciente 1559 também apresentou a variante c.1744C>T:p.Arg582Cys, porém em homozigose, bem como suas filhas. O marido, com quadro clínico mais brando, apresentou a mutação em heterozigose. Já foram relatados casos em que as variantes que afetam o

códon 582 foram associadas a quadros mais brandos de lipodistrofia quando em heterozigose. A mutação p.Arg582Cys foi descrita por Mory *et al.* em 2012, em uma paciente brasileira de 57 anos, em heterozigose (58). Apresentava perda de gordura subcutânea apenas em membros inferiores e acúmulo em tronco, com início aos 20 anos. Além disso, desenvolveu DM e hipertensão arterial sistêmica. Foram também descritos casos com variantes nessa mesma região, porém com troca para outros aminoácidos (p.Cys582His) (131) e p.Cys582Ser (69), todos com casos mais brandos de perda de gordura, considerados atípicos, assim como o caso heterozigoto em questão. Isso pode se justificar pelo fato de que a variante no códon 582 afeta somente a lamina A, acarretando em disruptura da interação da lamina A com outras proteínas e com a cromatina, diferente das variantes que afetam também a tradução da laminina C, que levam a casos de LPF típica (73). Por outro lado, quando em homozigose, pode levar a um quadro mais severo, como visto nessa família, sugerindo um efeito dose-dependente da variante p.Arg582Cys. Estudos correlacionam o grau de comprometimento da lipodistrofia à zigosidade da variante no LMNA, demonstrando acometimento mais agressivo em casos de homozigose (58,132).

Outro caso em que a variante encontrada não se localiza no domínio globular carboxi-terminal foi o da probanda P1.686, em quem foi identificada a variante c.29C>T: p.Ter10Ile em heterozigose. Entretanto, o quadro clínico não é de LPF, mas de síndrome progeroide atípica (SPA). Na literatura, essa variante também se encontra associada à SPA, caracterizada por quadros de lipodistrofia generalizada, iniciada durante a puberdade, associada a DM e a hipertrigliceridemia grave (133,134).

Variante no AKT2 (p.Ser261Leu)

A probanda P1683 apresentou variantes candidatas em dois genes diferentes: LMNA (c.1396A>G: p.Asn466Asp) e AKT2 (c.782C>T:p.Ser261Leu). A irmã da paciente, que apresenta o mesmo fenótipo, também mostrou as variantes nos mesmos genes. Essa alteração

no *LMNA* já foi descrita em pacientes com casos típicos de LPF, como a probanda em questão (58), enquanto a variante no *AKT2* não possui descrição na literatura.

A Akt é uma proteína quinase serina/treonina composta de três domínios: o domínio de homologia à plecstrina na região amino-terminal, o domínio central catalítico e o domínio regulatório localizado na região carboxi-terminal.

Os mamíferos contêm três isoformas com 80% de homologia, conhecidas como Akt1, Akt2 e Akt3, expressas ubiquamente, mas com níveis variados entre os diferentes tecidos (135). O *AKT2* transcreve a proteína quinase AKT2, que participa da cascata de sinalização da insulina e tem papel fundamental na adipogênese. É altamente expressa em tecidos sensíveis à insulina e sua ativação ocorre em resposta a fatores de crescimento, um processo que requer sua fosforilação, que ocorre nos resíduos Thr309 e Ser474 (134) (Figura 18).

Fonte: Adaptada de (136)

Figura 18 - Representação esquemática do gene *AKT2*. N: região amino-terminal; PH: domínio de homologia à plecstrina; C: região carboxi-terminal; seta: local da variante S261L encontrada em nosso estudo.

Em ratos, a ausência do *AKT2* levou à lipodistrofia grave, com resistência insulínica (137). Há relato de uma família que apresentou quadro clínico de perda de gordura nas extremidades e DM aos 30 anos, com resistência insulínica com uma variante em heterozigose no *AKT2* (p.Arg274His) (75). Em cultura celular com a quinase mutante, houve

prejuízo da sinalização insulínica e inibição da AKT selvagem. Além disso, em ratos houve diminuição do acúmulo de gordura nas células com a proteína mutante. A variante de nosso estudo encontra-se no mesmo domínio funcional dessa descrita: domínio catalítico da proteína serina/treonina quinase (138), local onde ocorre a fosforilação, sugerindo um efeito semelhante, quando alterada.

Não há relato de etiologia digênica em LPF.

Variante no *PPARG* (p.Val318Met)

Na probanda 1797, uma variante do tipo *missense* foi encontrada no exon 6 do gene *PPARG* (c.952G>A/ p.Val318Met). Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) são fatores de transcrição ligantes dependentes que regulam a expressão do gene-alvo pela ligação a específicos elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPREs), situados em sítios regulatórios de cada gene (139). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcricionais, resultando em aumento na transcrição gênica (139). Os PPARs, como outros receptores nucleares, possuem estrutura formada por domínios funcionais. O domínio A/B (amino-terminal) é pouco conservado. Seu estado de fosforilação contribui para a modulação da atividade do *PPARG*. Está localizado próximo ao sítio de ativação transcricional independente de ligante (AF-1). O domínio C (ou DBD – DNA *binding domain* – domínio de ligação ao DNA) contém os dedos de zinco, que são dois arranjos proteicos constituídos de uma α -hélice e uma folha β -pregueada, mantidas unidas por um íon de zinco na região central, que confere maior estabilidade de dobramento, permitindo associações firmes quando da ligação aos PPREs na região regulatória de genes responsivos ao PPAR. Além disso, é formado pela região D, importante como cofator e pela região EF (carboxi-terminal), a qual possui o domínio LBD (*ligand binding domain* – domínio de ligação ao ligante) e o sítio de ativação transcricional dependente de ligante (AF-2)

(figura 19). Os domínios DBD e LBD são as regiões mais conservadas em todos os PPARs (139).

Fonte: Adaptado de (140)

AF-1: sítio de ativação transcricional independente de ligante; A/B: domínio amino-terminal; DBD: *DNA binding domain* – domínio de ligação ao DNA; LBD: *ligand binding domain* – domínio de ligação ao ligante; AF-2: sítio de ativação transcricional dependente de ligante.

Figura 19 - Representação esquemática da proteína PPARG e da região onde está a variante V318M

O *PPARG* é expresso em diversos tecidos, com papel destacado nos tecidos metabolicamente importantes na homeostase da glicose, por exemplo, músculo esquelético, fígado e células betapancreáticas. É um fator de transcrição crítico na adipogênese. Alterações em heterozigose levam ao efeito dominante negativo, inibindo a diferenciação dos adipócitos. A variante encontrada nesse estudo foi descrita previamente na literatura associada à resistência insulínica e, posteriormente, à perda de gordura nas extremidades (105,141). Além disso, encontra-se em um sítio importante para a função proteica, além de ser um sítio altamente conservado. O estudo funcional realizado por Barroso *et al.* demonstrou alteração na estrutura proteica na presença dessa mutação, prejudicando a função do LBD (105).

5.2 Considerações finais

O presente estudo fez parte de uma iniciativa de um centro de referência de DM monogênico (87) e possibilitou o estudo genético de formas raras de DM que, quando agrupados, tornam o SLE uma ferramenta vantajosa, comparado às técnicas convencionais. Além disso, incluiu pacientes oriundos de diferentes regiões do Brasil, o que permitiu ampliar o conhecimento clínico de síndromes raras de diabetes.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver e implantar um painel customizado de sequenciamento em larga escala para o diagnóstico genético-molecular das formas raras de diabetes monogênico.

Nossos resultados demonstram que a análise de genes associados com diabetes monogênicos raros por meio de um painel customizado de sequenciamento em larga escala foi efetivo para permitir a análise das regiões alvos escolhidas e estabelecer o diagnóstico genético-molecular em 23 de 42 pacientes analisados.

Foi possível estabelecer a correlação genótipo-fenótipo, e a maioria das variantes candidatas identificadas, de acordo com a classificação ACMG, tem um papel no fenótipo.

7. ANEXOS

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexos

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F
 DATA NASCIMENTO:...../...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:.....
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:...../...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:.....
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Determinação da Base
Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico"

1. PESQUISADOR : Milena Gurgel Teles Bezerra
 CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador Científico INSCRIÇÃO CONSELHO
 REGIONAL CRM Nº 101806 UNIDADE: Laboratório de Endocrinologia Celular e
 Molecular - LIM-25/FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

Anexos

O senhor está sendo convidado a participar de forma voluntária de um estudo intitulado **"Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico"**. O senhor é portador de diabetes mellitus, possui familiares com a mesma condição, além de características clínicas e laboratoriais que configuram um tipo de diabetes genético. O presente projeto tem como objetivo realizar a investigação da ocorrência de alterações nos genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características das pessoas) em indivíduos portadores de diabetes monogênico. Com isso, pretendemos determinar a prevalência desse tipo de diabetes em brasileiros. Para que seja feito esse estudo, é necessária a coleta de sangue de seu braço. O sangue coletado será utilizado para fazer extração de estruturas presentes nas células (o DNA) que representam os genes e para realização de exames laboratoriais de rotina necessários para o diagnóstico e seguimento do diabetes.

O senhor poderá obter um benefício direto ao participar desse estudo, já que a identificação de defeitos nos genes responsáveis por esse tipo de diabetes pode modificar seu tratamento e prever a evolução da doença. Além disso, caso sejam encontradas alterações genéticas, será possível proporcionar aconselhamento genético para seus familiares que poderão ser convocados para participar desta pesquisa.

O senhor terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Milena Gurgel Teles Bezerra que pode ser encontrada no endereço Rua Dr. Amaldo nº 455 - 4º andar Sala 4305 - Lab. de Endo. Mol. Cel. Telefone (11) 3061.8458. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 - E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br.

O senhor terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar desse estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a dos outros participantes do estudo, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

O senhor terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

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

Anexos

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

O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico". Eu discuti com a Dra. Milena Gurgel Teles Bezerra sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/ representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

Anexo 2 – Formulários eletrônicos para seleção de casos de diabetes monogênico

Questionário de Diabetes Neonatal - Dados Clínico-laboratoriais - Casos Índices

GRUPO DE DIABETES MONOGÊNICO
Unidade de Endocrinologia Genética - LIM25 / Unidade de Diabetes
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP)

*Obrigatório

1. Endereço de e-mail *

2. Nome completo do paciente *

3. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

☐ Masculino

☐ Feminino

4. Registro HCFMUSP

(se disponível)

5. Telefone de contato do paciente

(DDD) número do telefone

6. Médico solicitante *

7. Telefone de contato do médico solicitante

(DDD) + número do telefone

8. CRM do médico solicitante *

9. E-mail de contato do médico solicitante *

10. Local do serviço de origem *

(exemplo: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP)

11. Data da coleta de sangue para análise genética

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

12. Cidade e Estado de nascimento *

13. Data do nascimento *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

14. Idade atual *

(anos)

15. Idade do diagnóstico de diabetes *

(Em meses)

16. Peso ao nascimento

(g)

17. Peso ao diagnóstico *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Baixo peso
☐ Peso normal
☐ Sobrepeso
☐ Obesidade

18. Estatura ao diagnóstico

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Estatura normal
☐ Baixa estatura

19. Estatura atual (cm/Z escore)

Ex.: 125 cm/-2,5 DP

20. IMC atual (kg/m² e percentil)Ex.: 17 kg/m² - p95%**21. Associações clínicas ****Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Atraso do desenvolvimento
- ☐ Epilepsia
- ☐ Malformações cardíacas
- ☐ Malformações renais
- ☐ Malformações pancreáticas
- ☐ Hipotireoidismo
- ☐ Nenhuma das anteriores
- ☐ Outro: _____

Seção sem título**22. Sintomas relacionados à hiperglicemia ao diagnóstico ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sintomático *Ir para a pergunta 22.*
- ☐ Assintomático *Ir para a pergunta 23.*

Sintomático**23. Quadro clínico ****Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Poliúria
- ☐ Polifagia
- ☐ Polidipsia
- ☐ Perda de peso
- ☐ Cetoacidose

*Ir para a pergunta 24.***Assintomático****24. O que motivou o diagnóstico de diabetes? ****Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Exame de rotina
- ☐ Doença intercorrente (ex: infecção urinária; infecção respiratória...)
- ☐ Exame com glicosúria (urina 1)
- ☐ Diagnóstico de diabetes na família
- ☐ Diabetes gestacional

Ir para a pergunta 24.

Tratamento do diabetes

25. **Tratamento na época do diagnóstico de diabetes ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Apenas insulina
- ☐ Insulina + anti-diabético oral
- ☐ Apenas sulfoniluréia
- ☐ Apenas metformina
- ☐ Apenas inibidor de DPP4
- ☐ Associações de anti-diabéticos orais
- ☐ Apenas dieta

26. **No caso de tratamento medicamentoso, informar o tempo entre a idade do diagnóstico e o início do tratamento**

Informar número de dias ou meses ou anos

27. **Duração do tratamento previamente descrito**

Informar número de dias ou meses ou anos

28. **Tratamento atual do diabetes ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Apenas insulina *Ir para a pergunta 28.*
- ☐ Insulina + anti-diabético oral *Ir para a pergunta 31.*
- ☐ Apenas sulfoniluréia
- ☐ Apenas metformina *Ir para a pergunta 36.*
- ☐ Apenas inibidor de DPP4 *Ir para a pergunta 36.*
- ☐ Associações de anti-diabéticos orais *Ir para a pergunta 35.*
- ☐ Apenas dieta *Ir para a pergunta 36.*

Tratamento atual do DM

Insulina

29. **Tipo de insulina ***

Marque todas que se aplicam.

- ☐ NPH
- ☐ Regular
- ☐ Análogos de insulina (ação lenta)
- ☐ Análogos de insulina (ação ultra-rápida)

30. **Dose total de insulina utilizada ***

(unidades/kg/dia)

31. **Tempo de uso de insulina ***
(informar se em meses ou anos)

Ir para a pergunta 36.

Tratamento atual do DM

Associação insulina + anti-diabético oral (ADO)

Insulina

32. **Tipo de insulina utilizada (associada a ADO) ***
Marque todas que se aplicam.

- ☐ NPH
☐ Regular
☐ Análogos de insulina (ação lenta)
☐ Análogos de insulina (ação ultra-rápida)

33. **Dose total de insulina utilizada (associada a ADO) ***
(unidades/dia)

34. **Tempo de uso de insulina (associada a ADO) ***
(informar se em meses ou anos)

Anti-diabéticos orais

35. **ADO(s) utilizado(s) na associação ***
Marque todas que se aplicam.

- ☐ Sulfoniluréia
☐ Metformina
☐ Inibidor de DPP4
☐ Outro: _____

Ir para a pergunta 36.

Tratamento atual do DM

Associações de anti-diabéticos orais (ADOs)

36. Associações de ADOs*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sulfoniluréia + metformina
- ☐ Sulfoniluréia + inibidor de DPP4
- ☐ Metformina + inibidor de DPP4
- ☐ Sulfoniluréia + metformina + inibidor de DPP4
- ☐ Outro: _____

Antecedente Familiar**37. História familiar de diabetes? ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim *Ir para a pergunta 37.*
- ☐ Não *Ir para a pergunta 53.*
- ☐ Desconhecido *Ir para a pergunta 53.*

Com antecedente familiar**38. Número de familiares com diabetes ***

39. Pais com DM? **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim *Ir para a pergunta 39.*
- ☐ Não *Ir para a pergunta 45.*
- ☐ Não soube informar *Ir para a pergunta 45.*

*Ir para a pergunta 39.***Histórico familiar de DM - Pais****40. Parentesco ***

(pai ou mãe)

41. Idade atual (anos) *

[ou informar se falecido(a)]

42. Idade do diagnóstico do diabetes **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Antes dos 25 anos
- ☐ De 25 a 35 anos
- ☐ De 36 a 45 anos
- ☐ Acima de 45 anos

43. Obesidade ou sobrepeso ao diagnóstico? **Marcar apenas uma oval.*☐ Sim☐ Não**44. Tipo de diabetes referido ****Marcar apenas uma oval.*☐ DM1☐ DM2☐ não sabe o tipo**45. Tratamento atual ****Marque todas que se aplicam.*☐ Insulina☐ Sulfoniluréia☐ Metformina☐ Apenas dieta☐ Outros**Histórico familiar de DM****46. Avós com DM? ****Marcar apenas uma oval.*☐ Sim *Ir para a pergunta 46.*☐ Não *Ir para a pergunta 52.*☐ Não soube informar *Ir para a pergunta 52.***Histórico familiar de DM - Avós****47. Parentesco ***

[avô ou avó - especificar se materno(a) ou paterno(a)]

48. Idade atual (anos) *

[ou informar se falecido(a)]

49. Idade do diagnóstico do diabetes **Marcar apenas uma oval.*☐ Antes dos 25 anos☐ De 25 a 35 anos☐ De 36 a 45 anos☐ Acima de 45 anos

50. Obesidade ou sobrepeso ao diagnóstico? **Marcar apenas uma oval.*☐ Sim☐ Não**51. Tipo de diabetes referido ****Marcar apenas uma oval.*☐ DM1☐ DM2☐ não sabe o tipo**52. Tratamento atual ****Marque todas que se aplicam.*☐ Insulina☐ Sulfoniluréia☐ Metformina☐ Apenas dieta☐ Outros**Histórico familiar de DM - Outros parentes diabéticos****53. Grau de parentesco dos demais familiares com DM-por favor especificar se materno ou paterno***(ex. 1 irmã e 2 tios paternos)*

*Ir para a pergunta 53.***Dados laboratoriais - AO DIAGNÓSTICO DE DIABETES - Caso Índice****54. Data aproximada da coleta para a realização dos exames laboratoriais abaixo ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012*

55. Glicemia de jejum **(mg/dL)*

56. Insulinemia de jejum*(μU/mL)*

57. **Peptídeo C de jejum**
(ng/mL)

58. **Peptídeo C pós-prandial**
(ng/mL)

59. **Glicosúria (urina 1) e glicemia concomitante -
Se disponível**

HbA1c

60. **Hemoglobina glicada (HbA1c) ***
(%)

61. **Método (HbA1c)**

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Imunoturbidimetria
☐ HPLC

Teste de tolerância oral à glicose

62. **Glicemia basal (0 minutos)**
(mg/dL)

63. **Glicemia aos 120 minutos**
(mg/dL)

Anticorpo anti-GAD

64. **Anticorpo anti-GAD ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 65.*
☐ Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 68.*
☐ Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 68.*

65. **Data da realização do exame (anti-GAD)**

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Anti-GAD positivo

66. **Título (anti-GAD) ***
(U/L)

67. **Método (anti-GAD)**

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Radioimunoensaio (RIA)
- ☐ ELISA

68. **Valor de referência utilizado (anti-GAD) ***

Anticorpo anti-tirosina fosfatase (IA2)

69. **Anticorpo anti-IA2 ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 70.*
- ☐ Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 73.*
- ☐ Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 73.*

70. **Data da realização do exame (anti-IA2)**

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Anti-IA2 positivo

71. **Título (IA2) ***
(U/L)

72. **Método (IA2)**

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Radioimunoensaio (RIA)
- ☐ ELISA

73. **Valor de referência utilizado (IA2) ***

Anticorpo anti-insulina (IAA)

74. **Anticorpo anti-IAA ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 75.*
- ☐ Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 78.*
- ☐ Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 78.*

75. Data da realização do exame (anti-IAA)

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Anti-IAA positivo

76. Título (IAA) *

(U/L)

77. Método (IAA)

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Radioimunoensaio (RIA)
- ☐ ELISA

78. Valor de referência utilizado (IAA) *

Proteína C reativa (PCR)

79. Dosagem (PCR) *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Realizada *Ir para a pergunta 79.*
- ☐ Não realizada *Ir para a pergunta 82.*

PCR dosada

80. Resultado (PCR) *

(mg/L)

81. Sensibilidade *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Convencional
- ☐ Ultra sensível

82. Valor de referência (PCR) *

Resposta ao tratamento

83. Houve melhora do controle glicêmico após início do tratamento? *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim *Ir para a pergunta 83.*
- ☐ Não *Ir para a pergunta 86.*

Resposta ao tratamento

84. Valor de HbA1c (%) no início do tratamento *

85. Valor mínimo de HbA1c (%) após o tratamento *

86. Tempo necessário de tratamento para redução da HbA1c *

Informar número de dias ou meses ou anos

Seguimento laboratorial

87. Possui dados laboratoriais de seguimento? *

(ex: glicemia, HbA1c)
Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim *Ir para a pergunta 87.*
- ☐ Não *Ir para a pergunta 100.*

Dados laboratoriais de seguimento

(Após o início do tratamento)

88. Data de realização dos exames de seguimento mais antigos *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

89. Data de realização dos exames de seguimento mais recentes *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Variação da glicemia de jejum

90. Glicemia mínima *

(mg/dL)

91. Glicemia máxima *

(mg/dL)

Variação de insulinemia de jejum

92. Insulinemia mínima

(μ U/mL)

93. **Insulinemia máxima**
(μ U/mL)

Variação de peptídeo C de jejum

94. **Peptídeo C de jejum mínimo**
(ng/mL)

95. **Peptídeo C de jejum máximo**
(ng/mL)

Peptídeo C de jejum APÓS 3 ANOS do diagnóstico

Se disponível

96. **Peptídeo C de jejum (ng/mL)**

97. **Glicemia de jejum (mg/dL)**
(concomitante à dosagem do peptídeo C)

98. **HbA1c (%)**
(concomitante à dosagem do peptídeo C)

Variação de HbA1c

99. **HbA1c mínima ***
(%)

100. **HbA1c máxima ***
(%)

Complicações do diabetes

101. **Retinopatia diabética ***
Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Investigação diagnóstica não realizada

102. **Fundoscopia**
(em caso positivo)

103. **Nefropatia diabética ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Investigação diagnóstica não realizada

104. **Microalbuminúria (mg/g de creatinina ou mg/min ou mg/24h)**
(em caso positivo)

105. **Neuropatia diabética ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Investigação diagnóstica não realizada

106. **Complicações macrovasculares ***

Marque todas que se aplicam.

- ☐ Doença arterial coronariana
☐ Acidente vascular cerebral
☐ Doença arterial periférica
☐ Não possui complicações macrovasculares
☐ Investigação diagnóstica não realizada

Perfil lipídico

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

107. **Investigação do perfil lipídico ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Realizada *Ir para a pergunta 107.*
☐ Não realizada *Ir para a pergunta 112.*

Perfil lipídico e ácido úrico

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

108. **Colesterol total ***
(mg/dL)

109. **HDL ***
(mg/dL)

110. **LDL ***
(mg/dL)

111. **Triglicerídeos ***
(mg/dL)

112. **Ácido Úrico**
(mg/dL)

Avaliação laboratorial renal

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

113. **Investigação laboratorial renal ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Realizada *Ir para a pergunta 113.*
☐ Não realizada *Ir para a pergunta 115.*

Avaliação laboratorial renal

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

114. **Creatinina ***
(mg/dL)

115. **Uréia**
(mg/dL)

Alterações renais

116. **Presença de alterações renais anatômicas e/ou funcionais? ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
☐ Não *Ir para a pergunta 118.*
☐ Investigação diagnóstica não realizada *Ir para a pergunta 118.*

Alterações renais

117. Alterações renais **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Disfunção renal
- ☐ Múltiplos cistos renais
- ☐ Hipoplasia renal
- ☐ Dilatação pielocalicial não obstrutiva
- ☐ Doença glomerulocística
- ☐ Outro: _____

118. Em caso de disfunção renal informar a relação temporal com o diagnóstico de diabetes*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Anterior ao diagnóstico de diabetes
- ☐ Após o diagnóstico de diabetes
- ☐ Concomitante ao diagnóstico de diabetes

Avaliação laboratorial hepática*(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)***119. Investigação laboratorial hepática ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Realizada
- ☐ Não realizada *Ir para a pergunta 123.*

Perfil hepático*(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)***120. TGO/AST ****(U/L)*

121. TGP/ALT **(U/L)*

122. FA (Fosfatase Alcalina)*(U/L)*

123. Gama-GT*(U/L)*

Alterações extra-pancreáticas

124. Anomalias do trato genital **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Investigação diagnóstica não realizada
- ☐ Sem alterações
- ☐ Cisto de epidídimo
- ☐ Útero bicornio
- ☐ Hipospadia
- ☐ Atresia de ducto deferente
- ☐ Outro: _____

125. Ultrassonografia abdominal **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Não realizada
- ☐ Sem alterações
- ☐ Nódulos hepáticos
- ☐ Cistos renais
- ☐ Outro: _____

Análise genético-molecular**126. Realizou pesquisa genético molecular? ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
- ☐ Não *Pare de preencher este formulário.*

Análise genético-molecular**127. Qual o método empregado? ****(exemplo: Sequenciamento por Sanger)*

128. Qual(is) o(s) gene(s) estudado(s)?

129. Qual a região gênica avaliada*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Todo(s) o(s) gene(s) candidato(s)
- ☐ Apenas regiões hot spot do(s) gene(s) candidato(s)

130. Resultado da análise*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ positiva
- ☐ negativa *Pare de preencher este formulário.*

Análise genético-molecular

131. Informar coordenadas da variante identificada

(exemplo: c.1744C>T / p.R582C)

☐ Envie para mim uma cópia das minhas respostas.

Powered by
Google Forms

Questionário - Lipodistrofias - Casos Índices

GRUPO DE DIABETES MONOGÊNICO

Unidade de Endocrinologia Genética - LIM25 / Unidade de Diabetes

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP)

*Obrigatório

1. Nome completo do paciente *

2. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

☐ Masculino

☐ Feminino

3. Registro HCFMUSP

(se disponível)

4. Telefone de contato do paciente

(DDD) número do telefone

5. Médico solicitante *

6. Telefone de contato do médico solicitante *

(DDD) número de telefone

7. CRM do médico solicitante *

8. E-mail de contato do médico solicitante *

9. Local do serviço de origem *

(exemplo: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP)

10. Suspeita clínica *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Lipodistrofia Congênita Generalizada tipo 1
- ☐ Lipodistrofia Congênita Generalizada tipo 2
- ☐ Lipodistrofia Congênita Generalizada tipo 3
- ☐ Lipodistrofia Congênita Generalizada tipo 4
- ☐ Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 1
- ☐ Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 2 (Dunnigan)
- ☐ Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 3
- ☐ Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 4
- ☐ Lipodistrofia Parcial Familiar tipo 5
- ☐ Displasia mandibuloacral

11. Data da coleta de sangue para análise genética

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

12. Cidade e Estado de nascimento *

13. Data do nascimento *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

14. Idade atual *

(anos)

15. Idade do diagnóstico de lipodistrofia *

16. Possui o Peso do paciente ao nascimento? *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não *Ir para a pergunta 18.*

17. Peso ao nascimento *

(g)

Seção sem título

18. Peso ao diagnóstico **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Baixo peso
- ☐ Peso normal
- ☐ Sobrepeso
- ☐ Obesidade
- ☐ Informação não disponível

19. Estatura atual *

cm

20. Peso atual *

Kg

Antecedentes familiares**21. Possui dados da origem da família materna? ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
- ☐ Não *Ir para a pergunta 23.*

Antecedentes familiares**22. Cidade e Estado de origem da família materna ***

Antecedentes familiares**23. Possui dados da origem da família paterna? ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
- ☐ Não *Ir para a pergunta 25.*

Antecedentes familiares**24. Cidade e Estado de origem da família paterna**

Antecedentes familiares

25. História de consanguinidade entre os pais? **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não soube informar

26. História familiar de aparência física similar e/ou de perda de gordura? **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim *Ir para a pergunta 27.*
- ☐ Não *Ir para a pergunta 28.*
- ☐ Não soube informar *Ir para a pergunta 28.*

Parentesco**27. Grau de parentesco com o probando**

Pai, mãe, primo de primeiro grau

Antecedentes pessoais**28. Presença de hiperfagia desproporcional? ***

Não parar de comer / acordar para comer / brigar por comida

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não soube informar

29. Antecedente de puberdade precoce ou pubarca precoce?*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
- ☐ Não *Ir para a pergunta 33.*
- ☐ Informação não disponível *Ir para a pergunta 33.*

Seção sem título**30. Idade da pubarca**

(anos)

31. Idade da telarca ou do aumento do volume testicular (> 4 mL)

(anos)

32. Idade da menarca

(anos)

Seção sem título

33. Ciclos menstruais *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Regulares
- ☐ Irregulares
- ☐ Amenorréia primária
- ☐ Amenorréia secundária
- ☐ Não se aplica

Características do exame físico

34. Ausência ou diminuição de tecido adiposo em: *

Marque todas que se aplicam.

- ☐ Face e pescoço
- ☐ Tronco e tórax
- ☐ Extremidades superiores
- ☐ Extremidades inferiores
- ☐ Regiões palmar e plantar
- ☐ Outro: _____

35. Acúmulo de tecido adiposo em: *

Marque todas que se aplicam.

- ☐ Face e pescoço
- ☐ Quadril e glúteos
- ☐ Extremidades inferiores
- ☐ Abdominal
- ☐ Sem acúmulo de tecido adiposo
- ☐ Outro: _____

36. Idade de aparecimento da perda de tecido adiposo *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Até 1 ano
- ☐ De 1 a 12 anos
- ☐ De 13 a 30 anos
- ☐ Após os 30 anos

37. Presença de musculatura proeminente? *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não

38. Presença de acantose nigricante? **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não avaliado

39. Presença de xantomias eruptivas? **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não avaliado

40. Presença de proeminência umbilical **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não avaliado

41. Presença de hepatomegalia à palpação? **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não avaliado

42. Presença de clitoromegalia **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
☐ Não
☐ Não avaliado

43. Possui hipertrigliceridemia? * ≥ 250 mg/dL*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
☐ Não *Ir para a pergunta 52.*

Dados Laboratoriais - Hipertrigliceridemia**44. Hipertrigliceridemia ****Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Grave (TG > 500 mg/dL)
☐ Níveis de TG que não respondem à terapia e/ou modificação dietética (≥ 250 mg/dL)
☐ Níveis de TG < 500 mg/dL ou boa resposta ao tratamento

45. Possui história de pancreatite associada à hipertrigliceridemia? **Marcar apenas uma oval.*☐

Sim

☐

Não

*Ir para a pergunta 47.***Pancreatite****46. Idade da pancreatite**

(anos)

Resposta ao tratamento da hipertrigliceridemia**47. Está em terapia medicamentosa para hipertrigliceridemia? ****Marcar apenas uma oval.*☐

Sim

☐

Não

*Ir para a pergunta 52.***Resposta ao tratamento da hipertrigliceridemia****48. Medicação em uso ****Marcar apenas uma oval.*☐

Bezafibrato

☐

Ciprofibrato

☐

Etofibrato

☐

Fenofibrato

☐

Genfibrozil

☐

Outro

☐

Outro:

49. Dose utilizada *

(mg/dia) - se outra medicação que não fibrato, descrever

50. Data de início do tratamento

Ex.: 25 de maio de 2013

51. Houve melhora dos valores de triglicerídeos após início do tratamento? **Marcar apenas uma oval.*☐

Sim

☐

Não

Dados laboratoriais de seguimento - Lípides

52. Data de realização dos exames de seguimento mais antigos *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

53. Data de realização dos exames de seguimento mais recentes *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

54. Valor máximo de triglicerídeos *
(mg/dL)

55. Valor mínimo de triglicerídeos *
(mg/dL)

56. Valor máximo de colesterol total *
(mg/dL)

57. Valor mínimo de colesterol total *
(mg/dL)

58. Valor máximo de HDL *
(mg/dL)

59. Valor mínimo de HDL *
(mg/dL)

60. Valor máximo de LDL *
(mg/dL)

61. Valor mínimo de LDL *
(mg/dL)

Dados Laboratoriais - Esteatose hepática ou esteatohepatite

62. Achados do exame imagem do fígado **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Esteatose hepática leve
- ☐ Esteatose hepática moderada
- ☐ Esteatose hepática severa
- ☐ Hepatomegalia
- ☐ Sem alterações
- ☐ Outro: _____

63. Qual método de imagem utilizado? **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Ultrassonografia
- ☐ Tomografia computadorizada
- ☐ Ressonância nuclear magnética

Perfil hepático**64. Data de realização dos exames de seguimento mais antigos ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012*
_____**65. Data de realização dos exames de seguimento mais recentes ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012*
_____**66. Valor mínimo de TGO ***(mg/dL)
_____**67. Valor máximo de TGO ***(mg/dL)
_____**68. Valor mínimo de TGP ***(mg/dL)
_____**69. Valor máximo de TGP ***(mg/dL)
_____**70. Valor mínimo de GGT ***(U/L)
_____**71. Valor máximo de GGT ***(U/L)

62. Achados do exame imagem do fígado **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Esteatose hepática leve
☐ Esteatose hepática moderada
☐ Esteatose hepática severa
☐ Hepatomegalia
☐ Sem alterações
☐ Outro: _____

63. Qual método de imagem utilizado? **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Ultrassonografia
☐ Tomografia computadorizada
☐ Ressonância nuclear magnética

Perfil hepático**64. Data de realização dos exames de seguimento mais antigos ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012*
_____**65. Data de realização dos exames de seguimento mais recentes ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012*
_____**66. Valor mínimo de TGO ***(mg/dL)
_____**67. Valor máximo de TGO ***(mg/dL)
_____**68. Valor mínimo de TGP ***(mg/dL)
_____**69. Valor máximo de TGP ***(mg/dL)
_____**70. Valor mínimo de GGT ***(U/L)
_____**71. Valor máximo de GGT ***(U/L)

Diabetes

82. Tem diagnóstico de diabetes? *

Marcar apenas uma oval.

☐ Sim

☐ Não

Características do diabetes

83. Idade ao diagnóstico de DM *

(anos)

84. Possui exames do diagnóstico de DM? *

Marcar apenas uma oval.

☐ Sim

☐ Não *Ir para a pergunta 93.*

Seção sem título

85. Glicemia de jejum ao diagnóstico

(mg/dL)

86. Insulinemia ao diagnóstico

(μ U/mL)

87. Peptídeo C de jejum ao diagnóstico

(ng/mL)

88. Peptídeo C pós-prandial ao diagnóstico

(ng/mL)

89. HbA1C ao diagnóstico

(%)

90. Método (HbA1c)

Marcar apenas uma oval.

☐ Imunoturbidimetria

☐ HPLC

☐ Outro: _____

Teste de tolerância oral à glicose ao diagnóstico

91. Glicemia basal (0 minutos)

(mg/dL)

92. Glicemia aos 120 minutos

(mg/dL)

Tratamento do DM

93. Tratamento na época do diagnóstico de diabetes *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Apenas dieta
- ☐ Apenas insulina
- ☐ Insulina + anti-diabético oral
- ☐ Apenas metformina
- ☐ Apenas sulfoniluréias
- ☐ Apenas inibidor de DPP4
- ☐ Apenas tiazolidinedionas
- ☐ Associação de anti-diabéticos orais
- ☐ Informação não disponível

94. No caso de tratamento medicamentoso, informar o tempo entre a idade do diagnóstico e o início do tratamento

Informar número de dias ou meses ou anos

95. Duração do tratamento previamente descrito

Informar número de dias ou meses ou anos

96. Tratamento atual do diabetes

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Apenas dieta *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Apenas insulina
- ☐ Insulina + anti-diabético oral *Ir para a pergunta 100.*
- ☐ Apenas metformina *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Apenas sulfoniluréias *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Apenas inibidor de DPP4 *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Apenas tiazolidinedionas *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Associação de anti-diabéticos orais *Ir para a pergunta 103.*

Tratamento atual do DM

Teste de tolerância oral à glicose ao diagnóstico

91. Glicemia basal (0 minutos)

(mg/dL)

92. Glicemia aos 120 minutos

(mg/dL)

Tratamento do DM

93. Tratamento na época do diagnóstico de diabetes *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Apenas dieta
- ☐ Apenas insulina
- ☐ Insulina + anti-diabético oral
- ☐ Apenas metformina
- ☐ Apenas sulfoniluréias
- ☐ Apenas inibidor de DPP4
- ☐ Apenas tiazolidinedionas
- ☐ Associação de anti-diabéticos orais
- ☐ Informação não disponível

94. No caso de tratamento medicamentoso, informar o tempo entre a idade do diagnóstico e o início do tratamento

Informar número de dias ou meses ou anos

95. Duração do tratamento previamente descrito

Informar número de dias ou meses ou anos

96. Tratamento atual do diabetes

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Apenas dieta *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Apenas insulina
- ☐ Insulina + anti-diabético oral *Ir para a pergunta 100.*
- ☐ Apenas metformina *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Apenas sulfoniluréias *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Apenas inibidor de DPP4 *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Apenas tiazolidinedionas *Ir para a pergunta 104.*
- ☐ Associação de anti-diabéticos orais *Ir para a pergunta 103.*

Tratamento atual do DM

103. **ADO (s) oral(s) usado(s) na associação ****Marque todas que se aplicam.*☐ Metformina☐ Sulfoniluréia☐ Inibidor de DPP4☐ Tiazolidinedionas☐ Outro: _____*Ir para a pergunta 104.***Dados laboratoriais de seguimento do DM**104. **Possui dados laboratoriais de seguimento? ****Marcar apenas uma oval.*☐ Sim☐ Não *Ir para a pergunta 113.***Dados laboratoriais do seguimento do DM**105. **Data de realização dos exames de seguimento mais antigos ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012*106. **Data de realização dos exames de seguimento mais recentes ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012***Variação da glicemia**

107. **Glicemia mínima ***

(mg/dL)

108. **Glicemia máxima ***

(mg/dL)

Variação da insulinemia de jejum

109. **Insulinemia mínima**

(μU/mL)

110. **Insulinemia máxima**

(μU/mL)

Variação de HbA1c

111. HbA1c mínima *
(%)

112. HbA1c máxima *
(%)

Complicações do DM

113. Possui complicações relacionadas ao DM? *
Marcar apenas uma oval.

☐ Sim

☐ Não

Complicações do DM

114. Quais? *
Marque todas que se aplicam.

- ☐ Retinopatia diabética
- ☐ Nefropatia diabética
- ☐ Neuropatia diabética
- ☐ Complicações macrovasculares

Outras comorbidades associadas à lipodistrofia

115. Possui alguma das comorbidades abaixo associadas à lipodistrofia? *
Marque todas que se aplicam.

- ☐ Lesões ósseas líticas focais
- ☐ Cistos ósseos
- ☐ Resistência à vitamina D
- ☐ Retardo mental
- ☐ Hérnia inguinal
- ☐ Hipertensão Arterial Sistêmica
- ☐ Hipertricose
- ☐ Nefrolitíase
- ☐ Nefropatia
- ☐ Não possui nenhuma outra comorbidade
- ☐ Outro: _____

Análise genético-molecular

116. Realizada pesquisa genético-molecular? *

Marcar apenas uma oval.

☐

Sim

☐

Não

Pare de preencher este formulário.

Análise genético-molecular

117. Qual o método empregado? *

(exemplo: Sequenciamento por Sanger)

118. Qual(is) o(s) gene(s) estudado(s)? *

119. Região gênica avaliada *

Marcar apenas uma oval.

☐

Todo(s) o(s) gene(s) candidato(s)

☐

Apenas regiões hot spot do(s) gene(s) candidato(s)

120. Resultado da análise *

Marcar apenas uma oval.

☐

Positiva

Ir para a pergunta 121.

☐

Negativa

Pare de preencher este formulário.

Análise genético-molecular

121. Informar coordenadas da variante identificada *

(exemplo: c.1744C>T / p.R582C)

Powered by

Anexo 3 - Transcritos referências dos genes relacionados a diabetes monogênio utilizados no presente estudo

Gene	Transcrito referência
<i>FOXP3</i>	NM_014009.3
<i>ABCC8</i>	NM_000352.3
<i>KCNJ11</i>	NM_000525
<i>ZFP57</i>	NM_001109809.2
<i>WFS1</i>	NM_001145853
<i>AGPAT2</i>	NM_006412.3
<i>BSCL2</i>	NM_032667.6
<i>LMNA</i>	NM_170707
<i>PPARG</i>	NM_015869
<i>AKT2</i>	NM_001626

Anexo 4 – Métricas de sequenciamento em larga escala das corridas, correspondentes aos pacientes com diabetes monogênico

Média das métricas por corrida	Primeira corrida		Segunda Corrida		Terceira Corrida		Quarta Corrida		Quinta Corrida		Sexta Corrida	
	Médi a	D P	Médi a	D P	Médi a	D P	Médi a	D P	Médi a	D P	Médi a	D P
Média de cobertura (x)	145	37	179	16	66	31	49	15	165	74	259	28
Percentual de região alvo com > 1 read (%)	100	0	100	0	99	3	99,62	0	100	0	100	0
Percentual de região alvo com > 10 reads (%)	100	0	99	0	98	1	95,53	4	99,86	0	99,78	0
Percentual de região alvo com > 20 reads (%)	99	0	99	0	93	5	85,98	13	99,46	0	99,22	0

Anexo 5 – Artigo em submissão para a revista *Diabetes Research and Clinical Practice*

1 Targeted massively parallel sequencing for congenital generalized lipodystrophy

2

3 Aline D. Costa-Riquetto¹, Lucas S. Santana², Lillian A. Caetano³, Antônio M. Lerário⁴, Joya E. M.
4 Correia-Deur⁵, Débora R. Bertola⁶, Chong A. Kim⁷, Márcia Nery⁸, Alexander A. L. Jorge⁹ and
5 Milena G. Teles^{10*}

6

7 ¹Monogenic Diabetes Group, Unidade de Endocrinologia Genética / LIM 25 e Unidade de Diabetes,
8 Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo,
9 SP, Brazil

10 ²Monogenic Diabetes Group, Unidade de Endocrinologia Genética / LIM 25 e Unidade de Diabetes,
11 Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo,
12 SP, Brazil

13 ³Monogenic Diabetes Group, Unidade de Endocrinologia Genética / LIM 25 e Unidade de Diabetes,
14 Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo,
15 SP, Brazil

16 ⁴Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular / LIM25,
17 Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo,
18 SP, Brazil

19 Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University
20 of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

21 ⁵Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular / LIM25,
22 Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo,
23 SP, Brazil

24 ⁶Unidade de Genética, Instituto da Criança, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

25 ⁷Unidade de Genética, Instituto da Criança, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

26 ⁸Unidade de Diabetes, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de
27 São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

28 ⁹Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular / LIM25,

29 Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo,
30 SP, Brazil

31 ¹⁰Monogenic Diabetes Group, Unidade de Endocrinologia Genetica / LIM 25 e Unidade de
32 Diabetes, Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo,
33 Sao Paulo, SP, Brazil

34

35 * *Corresponding author:*

36 Milena Gurgel Teles, MD, PhD

37 Monogenic Diabetes Group, Unidade de Endocrinologia Genética / LIM 25 e Unidade de Diabetes,
38 Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo

39 455, Dr. Arnaldo Avenue, 5th floor, room 5340, 01246-903, Sao Paulo, Brazil

40 Telephone: (55 011) 30617252/ Fax: (55 011) 30617252/milena.teles@usp.br

41

42 **Running title:** Deep sequencing for lipodystrophy

43 **Keywords:** congenital generalized lipodystrophy, Berardinelli-Seip syndrome, massively parallel
44 sequencing, deep sequencing

45 **Word count:** 1767

46 **Manuscript category:** Original article

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60 **ABSTRACT**

61 **Background:** Congenital generalized lipodystrophy (CGL) or Berardinelli-Seip syndrome is an
62 autosomal recessive disease characterized by the near-complete loss of adipose tissue. There are
63 four genetic subtypes of CGL and definitive diagnosis is based on genotyping. **Aim:** Our aim is to
64 establish genetic diagnosis of CGL using targeted massively parallel sequencing (MPS), also
65 known as next-generation sequencing (NGS). **Methods:** Seven unrelated individuals with a clinical
66 diagnosis of CGL were recruited. We used a customized panel to capture genes related to genetic
67 lipodystrophies. DNA libraries were generated, sequenced using the Illumina MiSeq, and
68 bioinformatics analysis was performed. **Results:** An accurate genetic diagnosis was stated for all
69 seven patients. Four had pathogenic variants in *AGPAT2* and three in *BSCL2*. Two large
70 homozygous deletions in *AGPAT2* were identified by copy-number variant analysis. **Conclusions:**
71 Although we have found allelic variants in only 2 genes related to CGL, the panel was able to
72 identify different variants including deletions that would have been missed by Sanger sequencing.
73 We believe that MPS is a valuable tool for the genetic diagnosis of multi-genes related diseases,
74 including CGL.

75

76

77

78

79 Background

80 Congenital generalized lipodystrophy (CGL) or Berardinelli-Seip syndrome is a rare group of
 81 autosomal recessive diseases characterized by the near-complete loss of adipose tissue [1,2]. The
 82 loss of body fat occurs at birth or within the first year of life, and is associated with prominent
 83 muscles and hepatosplenomegaly [3]. Because of a leptin deficiency, patients with CGL develop
 84 hyperphagia, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia at an early age. Later, usually in
 85 adolescence or early adulthood, affected individuals may present with Diabetes Mellitus (DM) and
 86 severe hepatic steatosis [2,4]. There are four genetic subtypes of CGL (CGL1–CGL4) caused by
 87 mutations in *AGPAT2* (OMIM #608594), *BSCL2* (OMIM #269700), *CAV1* (OMIM #612526), and
 88 *PTRF* (OMIM #613327), respectively [5]. The majority of the approximately 300 to 500 reported
 89 cases of CGL worldwide are caused by mutations in either *AGPAT2* or *BSCL2* [6]. Genetic
 90 diagnosis enables counseling of affected families and determination of the optimal therapeutic
 91 strategy, such as administration of recombinant human methionyl leptin [6,7]. Definitive diagnosis
 92 of CGL is usually based on genotyping using Sanger sequencing [8].

93 However, Sanger sequencing is laborious and time-consuming, specifically for large genes and
 94 diseases caused by multiple candidate genes [9]. In addition, Sanger technique is not suitable for
 95 the detection of large deletions [9]. Recently, massively parallel sequencing (MPS), also known as
 96 next-generation sequencing (NGS), has been demonstrated to be a cost-effective alternative for
 97 the diagnosis of monogenic diseases, overcoming the limitations of Sanger sequencing and
 98 enabling the simultaneous analysis of different genes and patients [10]. In this study, we performed
 99 targeted MPS using a customized panel to demonstrate its application in the genetic diagnosis of
 100 patients with CGL.

101 Materials and methods

102 Patients and Ethical statement

103 We studied seven probands. They were unrelated females with a clinical diagnosis of CGL, which
 104 was determined using the American Association of Clinical Endocrinologists consensus statement
 105 for the detection of lipodystrophy [2]. Our probands were identified as Proband 1 (P1) to Proband
 106 7 (P7), and were followed at Diabetes Outpatient Clinic of the University of São Paulo Medical

107 School. The median age of probands was 23.2 years old (4.5 to 38.8). Of note, all patients
 108 presented a generalized lack of adipose tissue in the first year of life and muscular hypertrophy. At
 109 physical examination, P 5-7 had absence of fat even in palms and soles, and that was preserved in
 110 P 1-4. Six of the seven (6/7) participants were from consanguineous families. Information
 111 regarding consanguinity for P2 was not available as the patient was adopted. Five of the seven
 112 (5/7) probands presented DM with median age of onset of 15 years old (4 to 18). Four out of the
 113 five patients (4/5) with DM were using high insulin doses. All (7/7) had hypertriglyceridemia. Only
 114 two of them (2/7), both children, did not present hepatomegaly and three (3/7) had hepatic
 115 steatosis. Three of the patients (3/7) had cardiomyopathy. The clinical features of all probands are
 116 summarized in Table 1. The Institute's Ethics Committee approved the study and the patients
 117 and/or legal guardians gave written informed consent.

118 Targeted array design

119 We designed a customized panel to capture the coding regions and intron-exon boundaries of the
 120 following genes related to CGL: *AGPAT2*, *BSCL2*, *CAV1* and *PTRF*. *LMNA* and *ZMPSTE24* were
 121 also included, as differential diagnosis of congenital generalized lipodystrophies, as well as familial
 122 partial lipodystrophy genes. The length of target fragments was approximately 488 kb, which spans
 123 all the exons examined.

124 Sample preparation and sequencing

125 DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using standard in-house protocols based on
 126 a salting-out method [11]. DNA libraries were prepared according to the manufacturer's
 127 instructions using the SureSelect XT Library Prep Kit ILM (Agilent Technologies, Santa Clara, CA,
 128 USA). Extracted DNA quality and yield was measured using a Tape Station (Agilent Technologies).
 129 Enriched target regions were sequenced (2 × 150 bp paired-end reads) using a MiSeq Analyzer
 130 (Illumina, San Diego, CA, USA).

131 Data analysis

132 Bioinformatics analysis was performed at the Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da
 133 FMUSP (SELA) using in-house analysis pipelines. Briefly, following quality control, reads were
 134 aligned to the reference human assembly (version b37 GRC/NCBI) using the Burrows-Wheeler

Alignment Tool (BWA-MEM) [12]. The resulting alignments were sorted by coordinates using Bamsort from the Biobambam2 suite [13]. FreeBayes was used to call single nucleotide variants (SNVs) and small insertions and deletions (indels) [14], which were annotated using ANNOVAR [15]. Copy-number variation (CNV) analysis was performed using Copy Number Targeted Resequencing Analysis (CONTRA) [16]. Metric analyses of the raw reads and alignments were performed using FASTQC and QUALIMAP, respectively [17][18]. Pathogenicity of identified variants were classified according to guidelines from the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) [19].

Results

The run produced an average of 698,290 reads that passed mapping quality filters and an average of 526,191 reads in total panel covered regions (75%). We found that the average read depth in analyzable target regions was 138.2 ± 39 per base with a median of 152 (range 117–228). Overall, > 98% of target regions had at least 20× coverage. Sequencing performance statistics are shown in detail in Figure 1 and Table 2.

We identified 173 coding variants in the 4 CGL genes in our seven probands. Of these variants, 20 were extremely rare, with an allele frequency less than 1% according to publicly available genomic databases (1000 Genomes Project and the Exome Aggregation Consortium - ExAC), of which five were homozygous disease causing variants [20,21]. Moreover, CONTRA enabled the identifications of two deletions.

Four of these variants were located in *AGPAT2* and resulted in a premature termination codon. P1 harbored a nonsense mutation in exon 5 (c.646A>T / p.Lys216*), whereas P3 had a splice-site mutation (c.589-2A>G) that produced a frameshift (p.Gln196fs*228). P2 and P4 had the same large homozygous deletion of exon 3 and part of exon 4, that caused a frameshift mutation (p.Gly106fs*188) (Figure 2).

In three of our seven patients, we identified mutations in *BSCL2*, which resulted in a premature stop codon. P5 harbored a C-to-T transition (c.412C>T / p.Arg138*), P6 had a frameshift indel (c.192_193delCCinsGGA / p.Ser64Argfs*12), and P7 had a frameshift duplication (c.325dupA / p.Thr109Asnfs*5).

163 All found variants were previously described and were considered pathogenic based on
164 ACMG/AMP diagnostic criteria. They were confirmed using Sanger sequencing.

165 Discussion

166 Our custom-designed panel enabled the genetic diagnosis of all seven probands with CGL, which
167 demonstrates targeted MPS is an accurate and efficient method for the genetic diagnosis of CGL.
168 We had a robust sequencing run obtaining 98.4% of analyzable target bases with at least 20×
169 reads. The 1.6% of analyzable target bases that did not achieve a minimal 20× read coverage
170 either were from genes not associated with CGL or were located in untranslated regions. An
171 exception was found in P4 that had poor coverage of exons 1, 2, and 11 in *BSCL2*. However, this
172 proband had a pathogenic deletion of exons 3 and 4 in *AGPAT2*.

173 Although this is a pilot study with only seven patients, we can recognize clinical similarities with
174 those previously reported. Hypertriglyceridemia and hepatomegaly are, as described, prevalent in
175 our probands. Besides, all patients with CGL-2 had absence of fat in palms and soles, in contrast
176 to those with CGL-1. Patients with CGL have an increased incidence of cardiomyopathy, that is
177 more frequent in CGL-2 [2,3,6,7]. We found that two of our three patients with *BSCL2* mutations
178 and only one of our four patients with *AGPAT2* mutations presented with this condition. Forty-five
179 percent of patients with lipodystrophy may develop DM, usually in the second decade of life [6].
180 We found the majority of patients (5/7) with DM. Patients with CGL and DM usually require higher
181 doses of insulin (>2 IU/Kg/d), as we can see in most (4/5) of our patients with diabetes. Metreleptin,
182 recombinant human methionyl leptin, is the first-line treatment for endocrine comorbidities and
183 insulin therapy can be reduced and even discontinued with its introduction [7]. Unfortunately, in our
184 country, metreleptin is not yet approved by regulatory government agencies.

185 Although there are peculiarities in the phenotype when different CGL genes are affected, they can
186 be very subtle to guide Sanger sequencing. Additionally, not all clinical features are present in the
187 early manifestation of the condition (stage when is hard to distinguish the types of CGL), so it is
188 important to have a wide genetic approach. MPS can promptly investigate a number of patients
189 through a single testing run while simultaneously examining a large number of genes for each
190 patient [9]. Furthermore, because of cost reductions and workflow improvements, the widespread

191 application of a common large-scale sequencing platform for multiple tests is a prevailing trend in
192 genetic analysis [9][20].

193 In this study, CONTRA was relevant, as an effective CNV detection tool. It uses base-level log-
194 ratios, which permits the inference of copy number gain and loss for each region, estimating a
195 significance based on the null distribution of log-ratios [16]. We found that using CONTRA was
196 important to overcome this limitation of conventional algorithms, and consequently, enabled the
197 identification of two large deletions in our cohort. These large deletions would not have been
198 detected by conventional bioinformatics analysis of MPS, neither by Sanger sequencing.

199 On the other hand, we argue if MPS would be the most cost-effective approach instead of Sanger
200 sequencing, since there are only two genes, *AGPAT2* and *BSCL2*, responsible for 90 to 95% of
201 cases of CGL [21]. In Brazil, studies have found that the frameshift duplication c.325dupA (also
202 described as 669insA) in *BSCL2* and the homozygous deletion of exons 3 and 4 in *AGPAT2* are
203 the most prevalent pathogenic variants [22–24]. In our study, we found that only three of our seven
204 probands had these variants (P2, P4, and P7), showing that these two entire genes must be
205 studied.

206 Rehm et al., recommended that the first step for clinical application of MPS should be adoption of
207 large multi-gene disease-targeted panels [9]. A target panel for monogenic causes of diabetes,
208 which includes genes that cause lipodystrophy, would be valuable in a diabetes research center as
209 ours. In a referral center, the assemblage of all monogenic diabetes cases would justify MPS use.

210 Conclusions

211 Our approach, which used a targeted MPS panel with standard bioinformatics analysis and
212 CONTRA, enabled an accurate and rapid diagnosis in a small cohort of patients with CGL. It also
213 allowed the identification of deletions that would not be able to be detected by Sanger sequencing.
214 We identified six different mutations in two of four genes associated with CGL. Our study
215 demonstrated that targeted MPS is an efficient tool for the genetic diagnosis of CGL. Conversely,
216 the advantage of routinely using MPS rather than Sanger sequencing out of the context of a
217 diabetes center is still an issue to be further analyzed.

218 Acknowledgments

219 The authors declare no competing interests in this article.

220 This work was supported by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) awarded to MGT
221 [Grant #2013/19920-2]; by the National Council for Scientific and Technological
222 Development (CNPq) awarded to ADCR [Grant #149811/2016-0]; by FAPESP to
223 Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da Rede Premium FMUSP on
224 behalf of AALJ [Grants #2013/03236-5 and #2014/50137] and by the National Council for
225 Scientific and Technological Development (CNPq) awarded to AALJ [Grant
226 #304678/2012-0].

227

228 REFERENCES

- 229 [1] Garg A. Lipodystrophies: Genetic and Acquired Body Fat Disorders. *J Clin Endocrinol Metab.*
230 2011;96:3313–25. doi:10.1210/jc.2011-1159.
- 231 [2] Handelsman Y. The clinical approach to the detection of lipodystrophy - an AACE
232 consensus statement. *Endocr Pract.* 2013;19:107–16.
- 233 [3] Garg A, Misra A. Lipodystrophies: rare disorders causing metabolic syndrome. *Endocrinol*
234 *Metab Clin North Am.* 2004;33:305–31. doi:10.1016/j.ecl.2004.03.003.
- 235 [4] Shalev A. Discovery of a lipodystrophy gene: one answer, one hundred questions. *Eur J*
236 *Endocrinol.* 2000;143:565–7.
- 237 [5] Garg A. Lipodystrophies. *Am J Med.* 2000;108:143–52. doi:10.1016/S0002-9343(99)00414-
238 3.
- 239 [6] Patni N, Garg A. Congenital generalized lipodystrophies—new insights into metabolic
240 dysfunction. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11:522–34. doi:10.1038/nrendo.2015.123.
- 241 [7] Brown RJ, Araujo-Vilar D, Cheung PT, Dunger D, Garg A, Jack M, et al. The Diagnosis and
242 Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J Clin*
243 *Endocrinol Metab.* 2016;101:4500–11. doi:10.1210/jc.2016-2466.
- 244 [8] Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed
245 synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94:441–8. doi:10.1016/0022-

- 2836(75)90213-2.
- [9] Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet*. 2013;14:295–300. doi:10.1038/nrg3463.
- [10] Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien L a, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437:376–80. doi:10.1038/nature03959.
- [11] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215–1215. doi:10.1093/nar/16.3.1215.
- [12] Burrows-Wheeler Aligner (BWA) n.d.:<http://bio-sourceforge.net>.
- [13] Bamsort from the Biobambam2 suite from bedtools n.d. <http://bedtools.readthedocs.io/en/latest/content/tools/bamtofastq.html>. (accessed August 1, 2016).
- [14] Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing 2012. doi:arXiv:1207.3907 [q-bio.GN].
- [15] Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:e164–e164. doi:10.1093/nar/gkq603.
- [16] Li J, Lupat R, Amarasinghe KC, Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, et al. CONTRA: copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics*. 2012;28:1307–13. doi:10.1093/bioinformatics/bts146.
- [17] Babraham Institute. Babraham Bioinformatics FastQC n.d. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (accessed April 1, 2016).
- [18] QualiMap n.d. <http://qualimap.bioinfo.cipf.es> (accessed April 1, 2016).
- [19] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405–23. doi:10.1038/gim.2015.30.
- [20] Mardis ER. New strategies and emerging technologies for massively parallel sequencing:

- 274 applications in medical research. *Genome Med.* 2009;1:40. doi:gm40 [pii]v10.1186/gm40.
- 275 [21] Haghighi A, Kavehmanesh Z, Haghighi A, Salehzadeh F, Santos-Simarro F, Van
 276 Maldergem L, et al. Congenital generalized lipodystrophy: identification of novel variants and
 277 expansion of clinical spectrum. *Clin Genet.* 2016;89:434–41. doi:10.1111/cge.12623.
- 278 [22] Lima JG, Nobrega LHC, de Lima NN, do Nascimento Santos MG, Baracho MFP, Jeronimo
 279 SMB. Clinical and laboratory data of a large series of patients with congenital generalized
 280 lipodystrophy. *Diabetol Metab Syndr.* 2016;8:23. doi:10.1186/s13098-016-0140-x.
- 281 [23] Gomes KB, Fernandes AP, Ferreira ACS, Pardini H, Garg A, Magré J, et al. Mutations in the
 282 Seipin and AGPAT2 Genes Clustering in Consanguineous Families with Berardinelli-Seip
 283 Congenital Lipodystrophy from Two Separate Geographical Regions of Brazil. *J Clin*
 284 *Endocrinol Metab.* 2004;89:357–61. doi:10.1210/jc.2003-030415.
- 285 [24] Fu M, Kazlauskaitė R, Paiva Baracho M de F, Nascimento Santos MG Do, Brandão-Neto J,
 286 Villares S, et al. Mutations in Gng3lg and AGPAT2 in Berardinelli-Seip Congenital
 287 Lipodystrophy and Brunzell Syndrome: Phenotype Variability Suggests Important Modifier
 288 Effects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2916–22. doi:10.1210/jc.2003-030485.
- 289
- 290
- 291

Figure 1 Sequencing performance of customized targeted massively parallel sequencing panel for congenital generalized lipodystrophy (CGL). The sequence depth of analyzable target regions (Y-axis on the right) and the percentage of analyzable target bases with at least 20 reads (Y-axis on the left) are provided for each proband (P1-P7) shown on the X-axis.

299
300 **Figure 2** Deletion of exon 3 and part of exon 4 in AGPAT2. A) Copy Number Targeted
301 Resequencing Analysis (CONTRA) plot of log ratio versus genome position showing deletion in

302 AGPAT2 (arrow). B) Integrative Genomics Viewer (IGV) image of AGPAT2 in Proband 4 and a
 303 control
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329

Anexo 6 - Artigo submetido na revista *Frontiers in Endocrinology*

CASE REPORT
published: 20 August 2018
doi: 10.3389/fendo.2018.00458

Homozygous and Heterozygous Nuclear Lamin A p.R582C Mutation: Different Lipodystrophic Phenotypes in the Same Kindred

Renan Magalhães Montenegro Jr.^{1*}, Aline Dantas Costa-Riquetto²,
Virgínia Oliveira Fernandes¹, Ana Paula Dias Rangel Montenegro¹,
Lucas Santos de Santana², Alexander Augusto de Lima Jorge²,
Lia Beatriz de Azevedo Souza Karbage¹, Lindenberg Barbosa Aguiar¹,
Francisco Herlânio Costa Carvalho¹, Milena Gurgel Teles² and Catarina Brasil d'Alva¹

¹ Brazilian Group for the Study of Inherited and Acquired Lipodystrophies, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, ² Monogenic Diabetes Group, Genetic Endocrinology Unit (LIM25), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Ondrej Šeda,
Charles University, Czechia

Reviewed by:

Eric Kalkhoven,
Utrecht University, Netherlands
Munis Dundar,
Erciyes University, Turkey

*Correspondence:

Renan Magalhães Montenegro Jr.
renanmmj@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Diabetes,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 08 March 2018

Accepted: 24 July 2018

Published: 20 August 2018

Citation:

Montenegro RM Jr,
Costa-Riquetto AD, Fernandes VO,
Montenegro APDR, Santana LS,
Jorge AAL, Karbage LBAS, Aguiar LB,
Carvalho FHC, Teles MG and
d'Alva CB (2018) Homozygous and
Heterozygous Nuclear Lamin
A p.R582C Mutation: Different
Lipodystrophic Phenotypes in the
Same Kindred.
Front. Endocrinol. 9:458.
doi: 10.3389/fendo.2018.00458

Background: Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD2) is a rare autosomal dominant disease caused by heterozygous mutations in the *LMNA* gene that results in regional loss of subcutaneous adipose tissue with onset in puberty. However, a generalized lipodystrophy phenotype has also been associated with heterozygous mutations in this gene, demonstrating the noticeable phenotypic heterogeneity of this disease.

Methods: We report and describe clinical and metabolic features of four patients from the same family with the p.R582C *LMNA* mutation, three homozygous and one in the heterozygous state that present with three distinct lipodystrophic phenotypes.

Results: Case description: The proband was a 12-year-old girl who developed severe subcutaneous fat atrophy in limbs and abdomen followed by a remarkable dorsocervical fat accumulation in adulthood along with diabetes at age 23. The proband's sister was a phenotypically normal girl who developed hypertriglyceridemia at age 8, progressive features of partial lipodystrophy at age 11, and diabetes at age 22. The proband's mother was first examined at age 32, presenting diabetes and a severe generalized lipodystrophic phenotype; she developed kidney failure at age 41 and died due to diabetic complications. The proband's father was a 50-year-old man with abdominal fat concentration that was initially considered phenotypically normal. Massively parallel sequencing using a platform of genes related to genetic lipodystrophies, followed by Sanger sequencing, revealed the transversion c.1744C>T at exon 11 of the *LMNA* gene (p.R582C) in the homozygous (mother and daughters) and heterozygous (father) states.

Conclusion: We documented three distinct phenotypes of the homozygous and heterozygous p. R582C *LMNA* mutation in the same kindred, illustrating that FPLD2 linked to mutations in this gene is a disease of great clinical heterogeneity, possibly due to associated environmental or genetic factors.

Keywords: Dunnigan, partial lipodystrophy, generalized lipodystrophy, *LMNA*, FPLD2, phenotypic heterogen

INTRODUCTION

Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD2; OMIM 151660) is a rare autosomal dominant disease characterized by regional loss of subcutaneous adipose tissue (limbs and trunk) that occurs progressively during peripubertal phase and is often associated with conspicuous insulin-resistance, diabetes, and other metabolic disturbances later in life (1, 2). Normal stores of fat are found in the bone marrow as well as intra-abdominal and intra-thoracic regions and excess fat may be deposited in the face, neck, back, and labia majora (2).

FPLD2 is attributed to heterozygous missense mutations in the *LMNA* gene (MIM150330) on chromosome 1q21–22 (3–5). Through alternative splicing, *LMNA* encodes lamins A and C, which are intermediate filament proteins consisting of a short N-terminal head, a central α -helical rod domain, and a large C-terminal tail containing a globular immunoglobulin-like domain; they form polymers at the nuclear lamina—a structural meshwork located in the inner aspect of the nuclear envelope—and interact with chromatin and integral proteins through binding sites in the rod domain and C-terminal tail. Lamins are regulators of structure, shape, and mechanical stability of the nucleus and have roles in DNA replication and repair, chromatin organization, spatial rearrangements of nuclear pore complexes, nuclear growth, and anchorage of nuclear envelope proteins (3).

Naturally occurring mutations in the *LMNA* gene have been described in distinct disease phenotypes called laminopathies whose spectrum includes FPLD2, skeletal and cardiac myopathies, neuropathies, premature aging syndromes, and overlapping syndromes (6–11). In FPLD2, the heterozygous amino acid changes are mostly located in the C-terminal domain of lamin A/C with a mutational hot-spot that substitutes the positively charged arginine at codon 482 with a neutral amino acid (4).

Two mechanisms were proposed to explain how *LMNA* mutations result in the observed diseases. *LMNA* mutations either impair the ability of the lamina in transmitting external mechanical signals into the nucleus and maintaining nuclear integrity (mechanical model) or impair the capacity of lamins in interacting with transcriptional regulators (gene expression model) (12). FPLD2-causing mutations possibly disrupt gene regulation, although the precise mechanism for this dysregulation and the resulting tissue manifestations are unclear. Recently, after discovering that miR-335 inhibits proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic and adipogenic lineages, it has been shown that this miRNA also plays a role in the etiology of FPLD2 (13). The heterozygous R482W mutation of the *LMNA* gene impairs the ability of lamin A in silencing the MEST/miR-335 locus in human adipose stem cells, resulting in elevated levels of the anti-adipogenic factor miR-335 observed in FPLD2 (14, 15).

In this report, we describe two severe and distinct lipodystrophic phenotypes associated with the p.R582C *LMNA* mutation in the homozygous state (one of them with generalized lipodystrophic features) and a less

severe phenotype in a heterozygous carrier in the same family.

MATERIALS AND METHODS

Clinical features as well as the laboratory and molecular data of four related patients are presented herein. This study was approved by the ethics committee of the Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil. The patients gave written informed consent for the study and for publication of their clinical, biochemical, and molecular data.

Blood samples were obtained after overnight fast. Blood glucose, cholesterol, and triglyceride levels were determined according to standard methods using automated equipment, serum insulin levels were determined by immunoassays with reagents provided by Roche Diagnostics (Basel, Switzerland), and hemoglobin A1c values were measured by ion exchange high performance liquid chromatography (HPLC). Plasma leptin levels were determined by an immunoassay using a commercial kit (DIAsource Immunoassays, Louvain-la-Neuve, Belgium).

Body fat distribution was assessed using whole body magnetic resonance imaging (MRI) performed in a 1.5-Tesla imaging device (GE Signa HDxt; Waukesha, Wisconsin). Pre-selected body segments were surveyed using contiguous axial and coronal 3.5-mm slices, a T1-weighted spin-echo sequence, and in-phase and out-of-phase T1 sequences for abdominal studies.

DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using standard in-house protocols based on a salting-out method (16). The proband's mother was analyzed by a customized massively parallel sequencing panel to capture the coding regions and intron-exon boundaries of the following genes related to genetic lipodystrophies, *AGPAT2*, *BSC12*, *CAVI*, *PTRF*, *LMNA*, *PLIN1*, *ZMPSTE24*, *AKT2*, *CIDEA*, *TBC1D4*, and *PPARG*. The panel included 51 genes related to monogenic forms of diabetes in addition to the mitochondrial genome (17). Length of the target region was approximately 488 kb, which spans all exons examined. Paired-end sequencing (2×150 bp) was performed using an Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA). Bioinformatics analysis was executed at the Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP (SELA), São Paulo, Brazil using in-house analysis pipelines. Pathogenicity of identified variants was classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) guidelines (18). After confirming the genetic diagnosis of the mother, the husband and daughters were investigated using Sanger sequencing (19).

RESULTS

Study Subjects

Patient 1 (Proband)

The proband (Figure 1) was a 12-year-old girl, born at full-term (birth weight, 3,600 g) as the first child of consanguineous

FIGURE 1 | Patient 1 (proband) with familial partial lipodystrophy bearing the homozygous p.R582C lamin A mutation at **(a,b)** age 12 with decompensated hypothyroidism. **(c)** One year after levothyroxine treatment. Adulthood **(d)** acanthosis nigricans. **(e,f)** fat accumulation in the neck and dorsocervical region, and **(g,h)** loss of subcutaneous tissue in the limbs and abdomen. Morphea hypochromic cutaneous lesions can be seen in the abdomen and trunk.

parents, referred to the Universidade Federal do Ceará Clinical Hospital, Fortaleza, Brazil for clinical assessment of short stature and learning disabilities that manifested since age 8. Physical examination revealed reduced fat in the arms, legs, and gluteal region, muscular hypertrophy, and acanthosis nigricans as well as macroglossia, dry and thickened skin, short stature, and pubertal stage Tanner 1. Proband was 118.7 cm (Z-score, -5.2) in height, weighed 27 kg, and had a body mass index (BMI) of 19.1 kg/m^2 . Thyroid function tests revealed severe primary hypothyroidism (TSH $> 100 \text{ uU/mL}$ and free T4 = 0.01 ng/dL) and thus the proband was started on levothyroxine resulting in catch-up growth and normal pubertal development with menarche by age 14.8. After hypothyroidism treatment, the selective loss of subcutaneous fat tissue in limbs, gluteal region, and abdomen became evident over time, leading to the diagnosis of lipodystrophy. At age 12, she presented with moderate hepatomegaly, umbilical hernia, hypertriglyceridemia (509 mg/dL), and acanthosis nigricans in the neck and axillary regions. One year later, at age 13, hypochromic and atrophic cutaneous plaques were observed distributed throughout the body. Skin biopsies revealed localized scleroderma (morphea). Some years later in adulthood, remarkable fat accumulation in the neck, face, and axillary and dorsocervical regions was observed, along with the worsening of subcutaneous fat

atrophy in limbs and abdomen, indicating partial lipodystrophy diagnosis.

At age 23, the proband was diagnosed with diabetes and albuminuria. Currently, she is 26 years old and presents with uncontrolled diabetes, hepatomegaly (10 cm below the costal margin), and irregular menses. She is 145 cm in height, weighs 42 kg, and has a BMI of 20.0 kg/m^2 . A formal assessment of intelligence quotient is not available, but she shows a slight degree of intellectual impairment. Standard serum determinations are listed in **Table 1**.

Patient 2 (Proband's Sister)

The proband's sister (**Figure 2**) was born at full-term with a birth weight of 4,800 g. She regularly accompanied her sister to the medical visits and was a phenotypically normal 8-year-old girl with hypertriglyceridemia (316 mg/dL) when the proband was first examined. By age 11, the proband's sister had started thelarche and after the onset of puberty, subtle clinical features of partial lipodystrophy became apparent. Her age at menarche was 13. Subcutaneous fat progressively disappeared from the limbs, gluteal region, and abdomen while fat accumulation became evident in the face, neck, and axillary and dorsocervical regions. She also developed intense acanthosis nigricans in the neck and axillary regions. At age 15, atrophic and hypochromic

TABLE 1 | Biochemical tests of patients with familial lipodystrophy.

Patient	LMNA Genotype	Age	BMI kg/m ²	Leptin ng/mL*	TC mg/dL	HDL mg/dL	LDL mg/dL	TG mg/dL	Glycemia mg/dL	A1c %	AST U/L	ALT U/L	GGT U/L	Albumin/creatinine mg/g
1. Proband	Homozygous	26	20.5	1.8	236	30	136	334	161	8.8	145	118	–	74
2. Sister	Homozygous	22	20.7	1.8	177	33	113	156	149	7.0	109	135	–	11.7
3. Mother	Homozygous	32	17.2	1.2	188	38	–	796	390	15.5	49	70	47	–
4. Father	Heterozygous	50	24.9	1.9	216	37	146	164	70	4.8	20	20	52	20.3

*Reference values of leptin (BMI 19–24 kg/m²): 0.5–3.2 ng/mL; (BMI 25–29 kg/m²): 0.5–14.6 ng/mL.

BMI, body mass index; TC, total cholesterol; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase.

FIGURE 2 | Patient 2 (proband's sister) with familial partial lipodystrophy bearing the homozygous p.R582C lamin A mutation in adulthood showing loss of subcutaneous tissue in limbs and abdomen, fat accumulation in neck and dorsocervical region, and notable acanthosis nigricans.

cutaneous plaques were found diffusely distributed and a biopsy was consistent with localized scleroderma.

Currently, she is 22 years old and has irregular menses, hepatomegaly (6 cm below the costal margin), and was recently diagnosed with diabetes. She is 163 cm in height, weighs 55 kg, and has a BMI of 20.7 kg/m². Standard serum determinations are listed in **Table 1**.

Patient 3 (Proband's Mother)

When the proband was first examined at our unit, a clinical examination of her mother (**Figure 3**) at age 32 revealed a severe generalized lipodystrophy phenotype. She relayed that this phenotype was present from birth and that her birth weight was 2,600 g. She underwent menarche at age 14, had regular menstrual periods, and was diagnosed with diabetes at age 24. She was 152 cm in height, weighed 40.4 kg, and had a BMI of 17.5 kg/m². She had no signs of acanthosis nigricans and her liver was palpable 3 cm below the costal margin. Serum determinations

at first visit are listed in **Table 1**. Subsequently during follow-ups, she underwent many hospitalizations due to uncontrolled diabetes, gluteal abscess, a foot ulcer, and toe amputation. At age 41, she was diagnosed with kidney failure and 1 year after receiving hemodialysis treatment, she died at age 42 due to diabetic complications.

Patient 4 (Proband's Father)

Initial clinical examination of the proband's father showed no evidence of lipodystrophy. He is a 50-year-old man with abdominal fat concentration, weighs 72.2 kg, is 170 cm in height, and has a BMI of 24.9 kg/m² (**Figure 4**). Standard serum determinations are listed in **Table 1** and the pedigree of the family is shown in **Figure 5**.

Molecular Results

Massively parallel sequencing using the platform of genes related to genetic lipodystrophies revealed that the proband's mother had

FIGURE 3 | Patient 3 (proband's mother) bearing the homozygous p.R582C lamin A mutation **(a,b)** at age 32 showing a phenotype of apparently generalized lipodystrophy without fat accumulation in the neck and face and without acanthosis nigricans. **(c)** Mother and daughters (from L-R: patients 1, 3, and 2) at ages 19, 32, and 15 years old (L-R).

FIGURE 4 | Proband's father bearing the heterozygous p.R582C lamin A mutation at age 50 and showing a subtle decrease in subcutaneous fat in the limbs and fat accumulation in the abdomen, without fat accumulation in the neck.

a homozygous genotype for the transversion c.1744C>T located at exon 11 of the *LMNA* gene, specifically encoding the lamin A isoform. This mutation leads to the substitution of arginine at position 582 by a cysteine (p.R582C).

Molecular studies of the daughters' genomes were performed using Sanger sequencing, which confirmed the p.R582C variant in the homozygous state. The proband's father was also tested and was found to have the same p.R582C but in a heterozygous state.

The c.1744C>T/p.R582C variant has been described as pathogenic by Mory et al. (20) and is registered in the Human Gene Mutation Database (HGMD) under the code CM124985.

MRI Results

An MRI scan was available for patient 2 (proband's sister). It showed near total absence of subcutaneous fat throughout the body in the analyzed body segments and preserved fat in the palms, soles, labia majora, and scalp. Retro-orbital fat was also present. Intraperitoneal, retroperitoneal, and perirenal fat was well preserved and there was a marked accumulation of fat in deep cervical regions as well as in the infraclavicular, axillary, and scapular regions. Bone marrow fat was markedly reduced in the spine and humerus, relatively preserved in the proximal femur, and normally preserved in the distal femur, tibia, fibula, and feet (**Figure 6**).

The MRI scan of patient 4 (proband's father) showed a less severe loss of subcutaneous fat throughout the body and preserved fat in the palms, soles, scalp, and retro-orbital regions. Intraabdominal, retroperitoneal, and perirenal fat was well preserved and there was a less severe fat accumulation in the deep cervical regions in comparison with his daughter. Bone marrow fat was also markedly reduced in the spine and humerus (Figure 6).

DISCUSSION

Familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type is an autosomal dominant disease with noticeable phenotypic heterogeneity.

All four family members were found to harbor the p.R582C mutation in nuclear lamin A. This variant has been previously reported in the heterozygous state in a 57-year-old Brazilian woman with decreased subcutaneous leg fat and a remarkable increase in trunk fat, a BMI of 30 kg/m², 34.6% total body fat, 32.9 µg/mL leptin, who was diagnosed with dyslipidemia and hypertension at age 36 and diabetes at age 43 (20). This patient came from a distinct region of Brazil and is apparently unrelated to the patients in this study, although a founder effect was not studied in these families.

We identified three distinct phenotypic variants in our patients. Patient 1 and 2 (daughters) show typical partial lipodystrophy while patient 3 (proband's mother) showed generalized lipoatrophy. The generalized and partial lipodystrophic phenotypes associated with the same mutation in a homozygous state is remarkable, suggesting that other genetic factors are modulating clinical expressivity of this disease. On the other hand, it is also possible that the apparent generalized phenotype is a result of poor nutritional status as the patients come from a poor region and have a low family income. The low BMI (17.2 kg/m²) of patient 3 (proband's mother) may have prevented the typical fat accumulation of FPLD2, thereby masking the disease, highlighting the diagnostic difficulties regarding nutritional status especially in underdeveloped regions where undernutrition is a problem.

While the three women were homozygous for the p.R582C mutation, patient 4 (proband's father) was a heterozygous carrier initially considered phenotypically normal. After discovering

that the father harbors the same mutation in a heterozygous state, a more careful clinical evaluation revealed a less severe phenotype of partial lipodystrophy that was confirmed by MRI. This phenotype is comparable to the patient described by Mory et al. (20), a carrier of the same heterozygous mutation and designated by the authors as "atypical partial lipodystrophy," which is a less severe loss of adipose tissue with less severe metabolic abnormalities. It is possible that this common phenotype characterized by thin legs and arms, scarcity of fat in the gluteal regions, and excess fat in the abdomen and trunk, often associated with metabolic disturbances and known as a Cushingoid pattern, may be part of the spectrum of body fat distribution in the general population. The phenotype of body fat distribution possibly results from a myriad of genetic variation—mainly single nucleotide polymorphisms (SNPs)—but may be related to more severe genetic variants linked to the pathological state of lipodystrophies in some cases. On the other hand, it is known that lipoatrophy diagnosis may be delayed in men owing to the less evident loss of subcutaneous fat. In fact, men are usually diagnosed after their female counterparts (21).

Whereas FPLD2 is an autosomal dominant disease, most mutations of the *LMNA* gene associated with a lipodystrophic phenotype were found in the heterozygous state. However, a few patients were described with homozygous mutations. Le Dour et al. (22) found the homozygous *LMNA* T655fsX49 mutation in seven probands from Reunion Island presenting with severe lipodystrophic syndrome, similar to that observed in typical FPLD2 due to the common heterozygous p.R482 substitutions. Eight relatives were heterozygous for the T655fsX49 mutation and two of them were clinically lipodystrophic with metabolic disturbances while the other six were completely asymptomatic, indicating that T655fsX49 *LMNA*-linked lipodystrophic syndrome has a codominant transmission with incomplete penetrance in heterozygotes. Andre et al. (23) compared 12 homozygous and 25 heterozygous individuals from Reunion Island harboring the T655fsX49 mutation and found that the lipodystrophic traits were more pronounced in the homozygous group as indicated by a BMI of 19.8 vs. 25.1 kg/m², 16.1 vs. 31.2% total body fat, and 2.4 vs. 11.2 ng/mL serum leptin levels in homozygous and heterozygous patients, respectively. There was no mention of any patient with a generalized phenotype in their study. The frequency of diabetes, hypertension, dyslipidemia, and hepatic steatosis tended to be higher in the homozygous group but did not reach statistical significance. These findings confirm a dose-dependent effect of the *LMNA* p.T655fs*49 mutation in affected patients.

Other cases of homozygous mutations of the *LMNA* gene related to lipodystrophic phenotypes have been published. Mory et al. (20) described a 26-year-old woman harboring the homozygous p.R584H *LMNA* substitution with a moderate reduction of subcutaneous fat in limbs and trunk, without submandibular or cervical fat accumulation, a BMI of 19 kg/m², and low serum leptin (1.1 µg/mL) and HDL-cholesterol levels. This patient was classified by the authors as having typical FPLD2 and her parents were first-degree cousins heterozygous for this mutation. The father could not be evaluated, but he apparently did not exhibit the phenotypic alterations of lipodystrophy

FIGURE 6 | T1-weighted magnetic resonance imaging of the (1) homozygous proband's sister and (2) the heterozygous father at the levels of (a) orbits and scalp, (b) anterior neck, (c) dorsocervical, (d) thoracolumbar spine, (e) abdomen, (f) pelvis and thighs, (g) knees, and (h) feet. It is worth noting that the sister and father's body mass indices are 20.7 and 24.9 kg/m², respectively. Note the diffuse absence in subcutaneous tissue of the homozygous proband's sister (indicated by the arrows in a,d-h) and excess fat deposition in the neck and dorsocervical area (indicated by the arrows in b,c).

and had mild dyslipidemia (HDL-cholesterol, 35 mg/dL; LDL-cholesterol, 142 mg/dL). The mother had vitiligo lesions and dyslipidemia (HDL-cholesterol, 58 mg/dL; LDL-cholesterol, 189 mg/dL) but no evidence of lipodystrophy or acanthosis. The same p.R584H *LMNA* mutation has been previously described in the heterozygous state in two patients with familial partial lipodystrophy and metabolic complications such as diabetes, dyslipidemia, and hepatic steatosis (24, 25).

Regarding the apparent generalized lipodystrophy in patient 3 (proband's mother), heterozygous mutations in the *LMNA* gene have also been detected in patients with a more extensive form of pubertal-onset generalized lipodystrophy and severe metabolic abnormalities (26, 27). Mory et al. (26) described a 15-year-old girl with pubertal-onset generalized atrophy of subcutaneous fat, including palmar and plantar regions, BMI of 15 kg/m², 8.6% body fat by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA), and severe metabolic disturbances; molecular studies revealed a heterozygous p.T10I mutation in the *LMNA* gene. Similarly, a 27-year-old man was described by Caux et al. (27) with generalized lipodystrophy of pubertal onset, BMI of 19.6 kg/m², 8.6% body fat by DEXA, and severe metabolic disturbances caused by

the heterozygous p.R133L *LMNA* mutation. Recently, Hussain et al. (28) described nine unrelated patients with generalized lipodystrophy due to the heterozygous T10I mutation; these mutations were present in the *LMNA* region encoding the N-terminal domain, while most of the mutations related to familial partial lipodystrophy are clustered in the C-terminal tail of this gene.

It is worth noting that the proband's mother (patient 3) and daughters (patients 1 and 2) were homozygous for this genetic variant. The parents of patient 3 were unrelated, but they are from a small country town in the state of Ceará in northeast Brazil that has 26,000 inhabitants and where consanguineous unions are frequent. On the other hand, patient 3 had a consanguineous marriage with a second-degree cousin, explaining the two homozygous daughters (patients 1 and 2).

The cutaneous manifestations of patients 1 and 2 are atypical. Interestingly, scleroderma skin lesions are present in some progeroid syndromes, such as Werner syndrome (WS) and Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). HGPS has been attributed to *LMNA* gene mutations while WS is most frequently caused by mutations in the *RECQL2* gene, which is

involved in DNA repair and telomerase maintenance process. However, some atypical cases of WS have been associated with heterozygous *LMNA* point mutations (29). This association suggests that the pathophysiological mechanism of scleroderma skin lesions may be related to abnormalities in the *LMNA* gene.

In this study, we identified a p.R582C mutation located in exon 11 of the *LMNA* gene affecting the C-terminal domain and specific for the lamin A isoform. Laminopathy phenotypes may be linked to the position of the *LMNA* mutation in relation to the nuclear localization sequence (NLS), which spans residues 416–423. Mutations associated with familial partial lipodystrophy are mostly downstream this point and in the C-terminal domain of lamin A/C (30); this domain of lamin A/C adopts an immunoglobulin fold-like structure and its tridimensional conformation is not disrupted by partial lipodystrophy associated mutations. Instead, these mutations alter the positive charge of the affected region, perturbing the interaction of lamin A/C with biological partners, such as transcriptional factors and regulators, and thus altering gene expression (31, 32).

In conclusion, we documented three distinct phenotypes of the p.R582C *LMNA* mutation in homozygous and heterozygous states in the same kindred. As this variant affects only lamin A and spares the other splice form, it may render a more severe phenotype when occurring in the homozygous state, suggesting a dose-dependent effect of the p.R582C *LMNA* mutation in affected patients. However, this mutation in a heterozygous state resulted in an uncertain phenotype and its homozygous state caused severe lipodystrophic syndromes with phenotypic differences. Our findings, as well as the previously described cases of generalized lipodystrophies due to *LMNA* mutations, illustrate that familial lipodystrophy linked to mutations in the *LMNA* gene is a disease of great clinical heterogeneity that is possibly due to associated environmental or genetic factors.

ETHICS STATEMENT

The protocol was approved by Walter Cantídio University Hospital Research Ethics Board, from Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Brazil. This study was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and written informed consent was obtained from all subjects.

AUTHOR CONTRIBUTION

RM and Cd contributed to the conception of the work, acquisition, and interpretation of data, as well as writing and the manuscript review. AJ and MT contributed to the analysis and interpretation of data and reviewed the manuscript. VE, AM, and LK contributed to the acquisition of data and manuscript edit and review. LA, FC, AC-R, and LS contributed to the acquisition, analysis, and interpretation of data.

FUNDING

This work was supported by grants 2013/19920-2 (to MT) and 2013/02162-8 (SELA-Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, Brazil and grant 301871/2016-7 and 459845/2014-4 (to AJ) from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brasília, Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Andreza Abraham Ohana de Souza, Francisca Roseli de Alcantara Madeiro and Samilla Ferreira Dantas for their technical support.

REFERENCES

- Kobberling J, Dunnigan MG. Familial partial lipodystrophy: two types of an X linked dominant syndrome, lethal in the hemizygous state. *J Med Genet.* (1986) 23:120–27. doi: 10.1136/jmg.23.2.120
- Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab.* (1999) 84:170–74.
- Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly and interactions. *J Struct Biol.* (1998) 122:42–66. doi: 10.1006/jsbi.1998.3987
- Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* (2000) 9:109–12. doi: 10.1093/hmg/9.1.109
- Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, et al. *LMNA*, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet.* (2000) 24:153–6. doi: 10.1038/72807
- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* (1999) 21:285–8. doi: 10.1038/6799
- Muchir A, Bonne G, van der Kooij AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet.* (2000) 9:1453–9. doi: 10.1093/hmg/9.9.1453
- Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction system disease. *New Engl J Med.* (1999) 341:1715–24. doi: 10.1056/NEJM199912023412302
- De Sandre Giovannoli A, Chaouch M, Koslov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, et al. Homozygous defects in *LMNA*, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins cause autosomal recessive axonal neuropathy in human. (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet.* (2002) 70:726–36. doi: 10.1086/339274
- Novelli G, Muchir A, Sangiulio F, Helbling Leclerc A, D'Apice MR, Massart G, et al. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in *LMNA*-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet.* (2002) 71:426–31. doi: 10.1086/341908
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* (2003) 423:293–8. doi: 10.1038/nature01629
- Gruenbaum Y, Foisner R. Lamins: nuclear intermediate filaments protein with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu Rev Biochem.* (2015) 84:131–64. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034115
- Tomé M, Lopez-Romero P, Albo C, Sepúlveda JC, Fernández-Gutiérrez B, Dopazo A, et al. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* (2011) 18:985–95. doi: 10.1038/cdd.2010.167
- Oldenburg AC, Briand N, Sorensen AL, Cahyani I, Shah A, Moskaug JO, et al. A lipodystrophy-causing lamin A mutant alters conformation and

- epigenetic regulation of the anti-adipogenic *MIR335* locus. *J Cell Biol.* (2017) 216:2731–43. doi: 10.1083/jcb.201701043
15. Elzein E, Wickström SA. Lipodystrophic laminopathy: lamin A mutation relaxes chromatin architecture to impair adipogenesis. *J Cell Biol.* (2017) 216:2607–10. doi: 10.1083/jcb.201707090
 16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* (1988) 16:1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215
 17. Caetano LA, Santana LS, Costa-Riquetto AD, Lerario AM, Nery M, Nogueira GF, et al. PDX1 -MODY and dorsal pancreatic agenesis: new phenotype of a rare disease. *Clin Genet.* (2018) 93:382–6. doi: 10.1111/cge.13044
 18. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of medical genetics and genomics and the Association for molecular pathology. *Genet Med.* (2015) 17:405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30
 19. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* (1975) 94:441–8. doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2
 20. Mory PB, Crispim F, Freire MB, Salles JE, Valério CM, Godoy-Matos AF, et al. Phenotypic diversity in patients with lipodystrophy associated with LMNA mutations. *Eur J Endocrinol.* (2012) 167:423–31. doi: 10.1530/EJE-12-0268
 21. Araujo-Vilar D, Loidi L, Domínguez E, Cabezas-Cerrato J. Phenotypic gender differences in subjects with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) due to a nuclear lamin A/C R482W mutation. *Horm Metab Res.* (2003) 35:29–35. doi: 10.1055/s-2003-38388
 22. Le Dour C, Schneebeli S, Bakiri F, Darcel F, Jacquemont ML, Maubert MA, et al. A homozygous mutation of prelamin-A preventing its farnesylation and maturation leads to a severe lipodystrophic phenotype: new insights into the pathogenicity of nonfarnesylated prelamin-A. *J Clin Endocrinol Metab.* (2011) 96:E856–62. doi: 10.1210/jc.2010-2234
 23. Andre P, Schneebeli S, Vigouroux C, Lascols O, Schaaf M, Chevalier P. Metabolic and cardiac phenotype characterization in 37 atypical Dunnigan patients with nonfarnesylated mutated prelamin A. *Am Heart J.* (2015) 169:587–93. doi: 10.1016/j.ahj.2014.12.021
 24. Vigouroux C, Magré J, Vantghem MC, Bourut C, Lascols O, Shackleton S, et al. Lamin A/C gene: sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipodystrophy. *Diabetes* (2000) 49:1958–62. doi: 10.2337/diabetes.49.11.1958
 25. Hegele RA, Cao H, Anderson CM, Hramiak IM. Heterogeneity of nuclear lamin A mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* (2000) 85:3431–5. doi: 10.1210/jc.85.9.3431
 26. Mory PB, Crispim F, Kasamatsu T, Gabbay MA, Dib SA, Moisés RS. Atypical generalized lipodystrophy and severe insulin resistance due to a heterozygous LMNA p.T101 mutation. *Arg Bras Endocrinol Metabol.* (2008) 52:1252–6. doi: 10.1590/S0004-27302008000800008
 27. Caux F, Duboscq N, Lascols O, Buendia B, Chazouillères O, Cohen A, et al. A new clinical condition linked to novel mutation in lamins A and C with generalized lipodystrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukodermic papules, liver steatosis and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* (2003) 88:1006–13. doi: 10.1210/jc.2002-021506
 28. Hussain H, Patni N, Ueda M, Sorkina E, Valerio CM, Cochran E, et al. A novel generalized lipodystrophy-associated progeroid syndrome due to recurrent heterozygous LMNA p.T101 mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* (2018) 103:1005–14. doi: 10.1210/jc.2017-02078
 29. Renard D, Fourcade G, Milhaud D, Bessis D, Esteves-Vieira V, Boyer A, et al. Novel LMNA mutation in atypical Werner syndrome presenting with ischemic disease. *Stroke* (2009) 40:e11–4. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.531780
 30. Hegele RA. LMNA mutation position predicts organ system involvement in laminopathies. *Clin Genet.* (2005) 68:31–4. doi: 10.1111/j.1399-0004.2005.00447.x
 31. Krimm I, Ostlund C, Gilquin B, Couprie I, Hossenlopp P, Mornon JP, et al. The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy and partial lipodystrophy. *Structure* (2002) 10:811–23. doi: 10.1016/S0969-2126(02)00777-3
 32. Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet.* (2002) 11:769–77. doi: 10.1093/hmg/11.7.769

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Montenegro, Costa-Riquetto, Fernandes, Montenegro, Santana, Jorge, Karbage, Aguiar, Carvalho, Teles and d'Alva. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Mayer-Davis EJ, Kahkoska AR, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Gong CX, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2018;19(Suppl):7-19.
2. IDF Diabetes Atlas. 8th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2017.
3. Environmental Systems Research Institute. InstantAtlas Reports. Redlands: ESR; 2018.
4. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13-27.
5. Yeung RO, Hannah-shmouni F, Niederhoffer K, Walker MA. Not quite type 1 or type 2 , what now ? Review of monogenic, mitochondrial, and syndromic diabetes. *Rev Endocr Metabolic Disord*. 2018;19(1):35-52.
6. Siklar Z, Franco E, Johnson MB, Flanagan SE, Ellard S, Ceylaner S, Kansu A, et al. Monogenic diabetes not caused by mutations in *mody* genes: a very heterogenous group of diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018;126(10):612-18.
7. Rubio-Cabezas O, Ellard S. Diabetes mellitus in neonates and infants: genetic heterogeneity, clinical approach to diagnosis, and therapeutic options. *Horm Research Paediatr*. 2013;80(3):137-46.

8. Witsch M, Kosteria I, Kordonouri O, Alonso G, Archinkova M, Besancon S, et al. Possibilities and challenges of a large international benchmarking in pediatric diabetology - The SWEET experience. *Pediatr Diabetes*. 2016;23(Suppl):7-15.
9. Gurgel LC, Moises RS. Diabetes melito neonatal. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(2):181-7.
10. Rubio-Cabezas O, Hattersley AT, Njølstad PR, Mlynarski W, Ellard S, White N, et al. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2014;15(Suppl 20):47–64.
11. Stekelenburg CM, Schwitzgebel VM. Genetic defects of the beta-cell that cause diabetes. *Endocr Dev*. 2016;31:179-202.
12. Gloyn AL, Reimann F, Girard C, Edghill EL, Proks P, Pearson ER, et al. Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum Mol Genet*. 2005;14(7):925-34.
13. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1838-49.
14. Babenko AP, Polak M, Cavé H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, et al. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2006;355(5):456-66.

15. Edghill EL, Flanagan SE, Patch A, Boustred C, Parrish A, Shields B, et al. Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. *Diabetes*. 2008;57(4):1034-42.
16. Stoy J, Greeley SA, Paz VP, Ye H, Pastore AN, Skowron KB, et al. Diagnosis and treatment of neonatal diabetes: an United States experience. *Pediatr Diabetes*. 2008;9(5):450-9 .
17. Russo L, Iafusco D, Brescianini S, Nocerino V, Bizzarri C, Toni S, et al. Permanent diabetes during the first year of life: multiple gene screening in 54 patients. *Diabetologia*. 2011;54(7):1693-701.
18. Stöß H, Pesch HJ, Pontz B, Otten A, Spranger J. Wolcott-Rallison syndrome: diabetes mellitus and spondyloepiphyseal dysplasia. *Eur J Pediatr*. 1982;138(2):120-9.
19. Wolcott CD, Rallison ML. Infancy-onset diabetes mellitus and multiple epiphyseal dysplasia. *J Pediatr*. 1972;80(2):292-7.
20. Johnson MB, Franco E De, Lango-allen H, Al A, Elbarbary N, Siklar Z, et al. Recessively inherited LRBA mutations cause autoimmunity presenting as neonatal diabetes. *Diabetes*. 2017;66(8):2316-2.
21. Flanagan SE, De Franco E, Lango Allen H, Zerah M, Abdul-Rasoul MM, Edge JA, et al. Analysis of transcription factors key for mouse pancreatic development establishes NKX2-2 and MNX1 mutations as causes of neonatal diabetes in man. *Cell Metab*. 2014;19(1):146-4.

22. Arima T, Drewell RA, Arney KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, et al. A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet.* 2001;10(14):1475-83.
23. Shaw-Smith C, De Franco E, Lango Allen H, Batlle M, Flanagan SE, Borowiec M, et al. GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes. *Diabetes.* 2014;63(8):2888-94.
24. Nagesh VS, Hattersley A, Ellard S, De Franco E, Flanagan S, Naseem A, et al. A Unique IL2RA mutation presenting as neonatal diabetes, congenital hypothyroidism and sepsis. *Horm Res Paediatr.* 2016;82(Suppl 1):P2-584.
25. Ellard S, Lango Allen H, De Franco E, Flanagan SE, Hysenaj G, Colclough K, et al. Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing. *Diabetologia.* 2013;56(9):1958-3.
26. Pearson ER, Flechtner I, Njølstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, et al. Switching from Insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med.* 2006;355(5):467-77.
27. Rafiq M, Flanagan SE, Patch AM, Shields BM, Ellard S, Hattersley AT, et al. Effective treatment with oral sulfonylureas in patients with diabetes due to sulfonylurea receptor 1 (SUR1) mutations. *Diabetes Care.* 2008;31(2):204-9.
28. Klupa T, Skupien J, Mirkiewicz-Sieradzka B, Gach A, Noczynska A, Zubkiewicz-Kucharska A, et al. Efficacy and safety of sulfonylurea use in permanent neonatal diabetes due to *KCNJ11* gene mutations: 34-month median follow-up. *Diabetes Technol Ther.* 2010;12(5):387-91.

29. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(4):200-13.
30. Domènech E, Gómez-Zaera M, Nunes V. Wolfram/DIDMOAD syndrome, a heterogenic and molecularly complex neurodegenerative disease. *Pediatric Endocrinol Rev.* 2006;3(3):249-57.
31. Zmyslowska A, Borowiec M, Fichna P, Iwaniszewska B, Majkowska L, Pietrzak I, et al. Delayed recognition of Wolfram syndrome frequently misdiagnosed as type 1 diabetes with early chronic complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014;122(1):35-8
32. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, et al. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet.* 1998;20(2):143-8.
33. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, et al. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest.* 2010;120(3):744-55.
34. Ribeiro MRF, Crispim F, Vendramini MF, Moisés RS. Síndrome de Wolfram: da definição às bases moleculares. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1994;50(5):839-44.
35. Amr S, Heisey C, Zhang M, Xia X-J, Shows KH, Ajlouni K, et al. A Homozygous mutation in a novel zinc-finger protein, ERIS, is responsible for Wolfram Syndrome 2. *Am J Hum Genet.* 2007;81(4):73-83.
36. Garg A. Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):3313-25.

37. Handelsman Y. The clinical approach to the detection of lipodystrophy - an AACE consensus statement. *Endocr Pract.* 2013;19:107-16.
38. Cortés VA, Fernández-Galilea M. Lipodystrophies: adipose tissue disorders with severe metabolic implications. *J Physiol Biochem.* 2015;71(3):471-8.
39. Patni N, Garg A. Congenital generalized lipodystrophies—new insights into metabolic dysfunction. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(9):522-34.
40. Seip M, Trygstad O. Generalized lipodystrophy. *Arch Dis Child.* 1963;38(201):447-53.
41. Agarwal AK, Simha V, Oral EA, Moran SA, Gorden P, O’Rahilly S, et al. Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4840-7.
42. Garg A. Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med.* 2004;350(12):1220-34.
43. Shalev A. Discovery of a lipodystrophy gene: one answer, one hundred questions. *Eur J Endocrinol.* 2000;143(5):565-7.
44. Prieur X, Le May C, Magré J, Cariou B. Congenital lipodystrophies and dyslipidemia. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(9):437.
45. Haque W, Garg A, Agarwal AK. Enzymatic activity of naturally occurring 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2 mutants associated with congenital generalized lipodystrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327(2):446-53.
46. Garg A. Lipodystrophies. *Am J Med.* 2000;108(2):143-52.

47. Garg A, Misra A. Lipodystrophies: rare disorders causing metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004;33(2):305-31.
48. Garg A, Wilson R, Barnes R, Arioglu E, Zaidi Z, Gurakan F, et al. A gene for congenital generalized lipodystrophy maps to human chromosome 9q34. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(9):3390-4.
49. Agarwal AK, Arioglu E, de Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, et al. AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet.* 2002;31(1):21-3.
50. Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Van Maldergem L, Sobel E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet.* 2001;28(4):365-70.
51. Szymanski KM, Binns D, Bartz R, Grishin N V., Li W-P, Agarwal AK, et al. The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(52):20890-5.
52. Kim CA, Delépine M, Boutet E, El Mourabit H, Le Lay S, Meier M, et al. Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with berardinelli-seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1129-34.
53. Garg A, Agarwal AK. Caveolin-1: A New Locus for human lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1183-5.
54. Kim S, Lee Y, Seo JE, Cho KH, Chung JH. Caveolin-1 increases basal and TGF-beta1-induced expression of type I procollagen through PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway in human dermal fibroblasts. *Cell Signal* . 2008;20(7):1313-9.

55. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, et al. Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2623-33.
56. Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):170-4.
57. Garg A. Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(5):1776-82.
58. Mory PB, Crispim F, Freire MBS, Salles JEN, Valério CM, Godoy-Matos AF, et al. Phenotypic diversity in patients with lipodystrophy associated with LMNA mutations. *Eur J Endocrinol*. 2012;167(3):423-31.
59. Valerio CM, Zajdenverg L, de Oliveira JEP, Mory PB, Moyses RS, Godoy-Matos AF. Body composition study by dual-energy x-ray absorptiometry in familial partial lipodystrophy: finding new tools for an objective evaluation. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):40.
60. Al-Attar SA, Pollex RL, Robinson JF, Miskie BA, Walcarius R, Little CH, et al. Quantitative and qualitative differences in subcutaneous adipose tissue stores across lipodystrophy types shown by magnetic resonance imaging. *BMC Med Imaging*. 2007;7(1):3.
61. Pandey SN, Pungavkar SA, Vaidya RA, Patkar D, Hegele RA, Sheth FJ, et al. An imaging study of body composition including lipodeposition pattern in a patient of familial partial lipodystrophy (Dunnigan type). *J Assoc Physicians India*. 2005;53:897-900.

62. Godoy-Matos AF, Moreira RO, Valerio CM, Mory PB, Moises RS. A New method for body fat evaluation, body adiposity index, is useful in women with familial partial lipodystrophy. *Obesity*. 2012;20(2):440-3.
63. Lorente Ramos RM, Azpeitia Armán J, Arévalo Galeano N, Muñoz Hernández A, García Gómez JM, Gredilla Molinero J. Absorciometría con rayos X de doble energía. Fundamentos, metodología y aplicaciones clínicas. *Radiologia*. 2012;54(5):410-23.
64. Yang Y, Wilder-Smith A, Panchalingam A, Oo Tha N, Paton NI. Changes in body fat measured by DXA in patients taking different formulations of stavudine. *HIV Clin Trials*. 2005;6(6):337-43.
65. Cavalcanti RB, Cheung AM, Raboud J, Walmsley S. Reproducibility of DXA estimations of body fat in HIV lipodystrophy: implications for clinical research. *J Clin Densitom*. 2005;8(3):293-7.
66. Petak S, Barbu CG, Yu EW, Fielding R, Mulligan K, Sabowitz B, et al. The official positions of the International Society for Clinical Densitometry: body composition analysis reporting. *J Clin Densitom*. 2013;16(4):508-19.
67. Bonnet E, Delpierre C, Sommet A, Marion-Latard F, Hervé R, Aquilina C, et al. Total body composition by DXA of 241 HIV-negative men and 162 HIV-infected men: proposal of reference values for defining lipodystrophy. *J Clin Densitom*. 2005;8(3):287-92.
68. Valerio CM, Godoy-Matos A, Moreira RO, Carraro L, Guedes EP, Moises RS, et al. Dual-Energy x-ray absorptiometry study of body composition in patients with lipodystrophy. *Diabetes Care*. 2007 ;30(7):1857-92.

69. Ji H, Weatherall P, Adams-Huet B, Garg A. Increased skeletal muscle volume in women with familial partial lipodystrophy, Dunnigan Variety. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1410-3.
70. Peters JM, Barnes R, Bennett L, Gitomer WM, Bowcock AM, Garg A. Localization of the gene for familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) to chromosome 1q21–22. *Nat Genet.* 1998;18(3):292-5.
71. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SNJ, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet.* 2000;24(2):153-6.
72. Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2000;9(1):109-12.
73. Speckman RA, Garg A, Du F, Bennett L, Veile R, Arioglu E, et al. Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan Variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *Am J Hum Genet.* 2000;66(4):1192-8.
74. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, et al. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature.* 1999;402(6764):880-3.
75. George S. A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science (80-).* 2004;304(5675):1325-8.

76. Rubio-Cabezas O, Puri V, Murano I, Saudek V, Semple RK, Dash S, et al. Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in *CIDEA*. *EMBO Mol Med*. 2009;1(5):280-7.
77. Gandotra S, Le Dour C, Bottomley W, Cervera P, Giral P, Reznik Y, et al. Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. *N Engl J Med*. 2011;364(8):740-8.
78. Bhayana S, Siu VM, Joubert GI, Clarson CL, Cao H, Hegele RA. Cardiomyopathy in congenital complete lipodystrophy. *Clin Genet*. 2002;61(4):283-7.
79. Agarwal AK. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor- gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):408-11.
80. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002;51(12):3586-90.
81. Semple RK. PPAR and human metabolic disease. *J Clin Invest*. 2006;116(3):581-9.
82. Monteiro L, Montenegro R, Foss-Freitas M, Foss M. Body fat distribution in women with familial partial lipodystrophy caused by mutation in the lamin A/C gene. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(1):136-8.
83. Haghighi A, Kavehmanesh Z, Haghighi A, Salehzadeh F, Santos-Simarro F, Van Maldergem L, et al. Congenital generalized lipodystrophy: identification of novel variants and expansion of clinical spectrum. *Clin Genet*. 2016;89(4):434-41.

84. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.
85. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005;437(7057):376-80.
86. Brown RJ, Araujo-Vilar D, Cheung PT, Dunger D, Garg A, Jack M, et al. The diagnosis and management of lipodystrophy syndromes: a multi-society practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(12):4500-11.
87. Grupo de Diabetes Monogênico - HCFMUSP. São Paulo: Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo[homepage na internet]; Encaminhamentos [acesso em 12 dez 2018]. Disponível em [http: https://www.diabetesgeneticousp.com/encaminhamentos](http://https://www.diabetesgeneticousp.com/encaminhamentos)
88. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
89. Johnsen JM, Nickerson DA, Reiner AP. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. *Blood.* 2018;122(19):3268-75.
90. Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, Song YS. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet.* 2011;12(6):443-51.

91. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-23.
- 92 - Jarvik GP, Browning BL. Consideration of cosegregation in the pathogenicity classification of genomic variants. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1077-81.
93. Program for personalized and genomic medicine, genetic variant interpretation tool. Baltimore: University of Maryland School of Medicine; 2015.
94. Tsuda M, Torgerson TR, Selmi C, Gambineri E, Carneiro-Sampaio M, Mannurita SC, et al. The spectrum of autoantibodies in IPEX syndrome is broad and includes anti-mitochondrial autoantibodies. *J Autoimmun*. 2010;35(3):265-8.
95. Gasparin MRR, Crispim F, Paula SL, Freire MBS, Dalbosco IS, Manna TD, et al. Identification of novel mutations of the WFS1 gene in brazilian patients with Wolfram syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2008;160(2):309-16.
96. Tessa A, Carbone I, Matteoli MC, Bruno C, Patrono C, Patera IP, et al. Identification of novel WFS1 mutations in italian children with Wolfram syndrome. *Hum Mutat*. 2001;17(4):348-9.
97. Zen PRG, Pinto LLC, Schwartz IVD, Barrett TG, Paskulin G. Relato de um paciente brasileiro com síndrome de Wolfram. *J Pediatr (Rio J)*. 2002;78(6):529-32.

98. Magré J, Delépine M, Van Maldergem L, Robert J-J, Maassen JA, Meier M, et al. Prevalence of mutations in AGPAT2 among human lipodystrophies. *Diabetes*. 2003;52(6):1573-8.
99. Mandal K, Aneja S, Seth A, Khan A. Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Indian Pediatr*. 2006;43(5):440-5.
100. Csoka AB. Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *J Med Genet*. 2004;41(4):304-8.
101. Montenegro RM, Costa-Riquetto AD, Fernandes VO, Montenegro APDR, Santana LS de, Jorge AA de L, et al. Homozygous and heterozygous nuclear lamin A p.R582C mutation: different lipodystrophic phenotypes in the same kindred. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:458.
102. Flanagan SE, Edghill EL, Gloyn AL, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in KCNJ11, which encodes Kir6.2, are a common cause of diabetes diagnosed in the first 6 months of life, with the phenotype determined by genotype. *Diabetologia*. 2006;49(6):1190-7.
103. Zwaveling-Soonawala N, Hagebeuk EE, Slingerland AS, Ris-Stalpers C, Vulsma T, van Trotsenburg AS. Successful transfer to sulfonylurea therapy in an infant with developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes (DEND) syndrome and a novel ABCC8 gene mutation. *Diabetologia*. 2011;54(2):469-71.
104. Flanagan SE, Patch A-M, Mackay DJG, Edghill EL, Gloyn AL, Robinson D, et al. Mutations in ATP-Sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. *Diabetes*. 2007;56(7):1930-7.

105. Barroso I, Gurnell M, Crowley VEF, Agostini M. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*. 1999; 402(6764):880-3.
106. Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2014;15(2):121-32.
107. Melo KM, Tavares B, Carvalho C. Células T regulatórias : mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2009;32(5):184-8.
108. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001;27(1):18-20.
109. Huter EN, Punkosdy GA, Glass DD, Cheng LI, Ward JM, Shevach EM. TGF- β -induced Foxp3 + regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur J Immunol*. 2008;38(7):1814-21.
110. Bin Dhuban K, Kornete M, S. Mason E, Piccirillo CA. Functional dynamics of Foxp3 + regulatory T cells in mice and humans. *Immunol Rev*. 2014;259(1):140-58.
111. Braskett MJ, Chatila T. IPEX: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked. Alphen aan den Rijn: Wolters Kluwer; 2018.
112. Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front Immunol*. 2012;3:211.

113. Haghvirdizadeh P, Mohamed Z, Abdullah NA, Haghvirdizadeh P, Haerian MS, Haerian BS. KCNJ11: genetic polymorphisms and risk of diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2015;2015:908152.
114. UniProtKB - Q09428 (ABCC8_Human): ATP-binding cassette sub-family C member 8. Hinxton: EMBL-EBI; Geneva: SIB; Washington: PIR; 2018.
115. EUCID.Net, European Network for Human Congenital Imprinting Disorders. Transient neonatal diabetes mellitus. Brussels: COST European Cooperation in Science and Technology, European Union; 2018.
116. De Franco E, Ellard S. Genome, exome, and targeted next-generation sequencing in neonatal diabetes. *Pediatr Clin North Am.* 2015; 62(4):1037-53.
117. Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Mol Aspects Med.* 2015;42:42-60.
118. Silva MER da, Mory D, Davini E. Marcadores genéticos e auto-imunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(2):166-80.
119. Hardy C, Kham F, Torres R, Scott-brown M, Seller A, Poulton J, et al. Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am J Hum Gene.* 1999;65(5):1279-90.
120. O'Neill MJF, McKusic VA. 606201 wolframin er transmembrane glycoprotein, WFS1 [Internet]. 2018 [cited 2018 Aug 10]. Available from: <http://omim.org/entry/606201>.

121. Tranebjærg L, Barrett T, Rendtorff ND. WFS1-Related disorders [Internet]. GeneReviews® [Internet]. 2009 [cited 2018 Sep 2]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK4144/figure/wfs.F1/report=objectonly.
122. Broekema MF, Massink MPG, De Ligt J, Stigter ECA, Monajemi H, De Ridder J, et al. A single complex Agpat2 Allele in a patient with partial lipodystrophy. *Front Physiol*. 2018;9:1363.
123. Lima JG, Nobrega LH, de Lima NN, do Nascimento Santos MG, Baracho MF, Jeronimo SMB. Clinical and laboratory data of a large series of patients with congenital generalized lipodystrophy. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8(1):23.
124. Gomes KB, Fernandes AP, Ferreira ACS, Pardini H, Garg A, Magré J, et al. Mutations in the seipin and AGPAT2 genes clustering in consanguineous families with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy from two separate geographical regions of Brazil. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(1):357-61.
125. Fu M, Kazlauskaite R, Baracho MF, do Nascimento Santos MG, Brandão-Neto J, Villares S, et al. Mutations in Gng3lg and AGPAT2 in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy and Brunzell syndrome: phenotype variability suggests important modifier effects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2916-22.
126. Wee K, Yang W, Sugii S, Han W. Towards a mechanistic understanding of lipodystrophy and seipin functions. *Biosci Rep*. 2014;34(5):583-91.

127. Gomes KB, Pardini VC, Ferreira ACS, Fonseca CG, Fernandes AP. Founder effect of the 669insA mutation in BSCL2 gene causing Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy in a cluster from Brazil. *Ann Hum Genet.* 2007;71(6):729-34.
128. Hattersley AT, Greeley SAW, Polak M, Rubio-Cabezas O, Njølstad PR, Mlynarski W, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: the diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2018;19:47-63.
129. Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S, Le L. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet.* 2002;11(7):769-78.
130. Hegele R. LMNA mutation position predicts organ system involvement in laminopathies. *Clin Genet.* 2005;68(1):31-4.
131. Garg A, Vinaitheerthan M, Weatherall PT, Bowcock AM. Phenotypic Heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin A/C gene 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):59-65.
132. Le Dour C, Schneebeil S, Bakiri F, Darcel F, Jacquemont M-L, Maubert M-A, et al. A Homozygous mutation of prelamina-A preventing its farnesylation and maturation leads to a severe lipodystrophic phenotype: new insights into the pathogenicity of nonfarnesylated prelamina-A. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):E856-62.
133. Mory PB, Crispim F, Kasamatsu T, Gabbay MAL, Dib SA, Moisés RS. Atypical generalized lipodystrophy and severe insulin resistance due to a heterozygous LMNA p.T10I mutation. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(8):1252-6.

134. Matsuo FS. Estudo da via de sinalização PI3K-Akt E GSK3β em carcinomas epidermóides metastáticos e não metastáticos de cavidade bucal [dissertação]. Uberlândia, MG: Universidade Federal de Uberlândia; 2015.
135. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004;9(6):667-76.
136. Scientists identify cause of severe hypoglycaemia: research provides the prospect of effective drug treatments for the genetic disorder [Internet]. Hinxton: Sanger Institute Press Office; 2011 [cited 2018 Nov 12]. Available from: <https://www.sanger.ac.uk/news/view/2011-10-07-scientists-identify-cause-of-severe-hypoglycaemia>.
137. Shearin AL, Monks BR, Seale P, Birnbaum MJ. Lack of AKT in adipocytes causes severe lipodystrophy. *Mol Metab*. 2016;5(7):472-9.
138. Model organism Aggregated Resources for Rare Variant ExpLoration, Marrvel 1.1 [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 3]. Available from: www.marrvel.org.
139. Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Ppargama): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(4):526-33.
140. Wei J. Regulation of matrix remodeling by peroxisome proliferator-activated receptor- γ : a novel link between metabolism and fibrogenesis. *Open Rheumatol J*. 2012;6(1):103-15.

141. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2003;52(4):910-7.