Lucas Santos de Santana

**Análise genético-molecular integrada aplicada ao processo de
investigação de pacientes com diagnóstico clínico de MODY
(*Maturity Onset Diabetes of the Young*)**

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

Coorientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de
Lima Jorge

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Lucas Santos de

Análise genético-molecular integrada aplicada ao processo de investigação de pacientes com diagnóstico clínico de MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) / Lucas Santos de Santana. -- São Paulo, 2017.

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

Orientadora: Milena Gurgel Teles Bezerra.

Coorientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Genética 2.Genética médica 3.Medicina molecular
4.Endocrinologia 5.Diabetes mellitus 6.Diagnóstico

USP/FM/DBD-286/17

DEDICATÓRIA

A Andreia Santos e Juarez Peixoto, responsáveis por iniciarem a transformação de um sonho em realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e especialmente à Dra. Milena Gurgel Teles Bezerra, pelo empenho durante a realização e orientação deste trabalho, e também, a toda a equipe do Laboratório de Investigação Médica 25 (Unidade de Endocrinologia Genética) sob responsabilidade do Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, e ao próprio, por todo o suporte oferecido.

EPÍGRAFE

“Não tente só ser melhor que seus contemporâneos ou predecessores, tente ser melhor que você mesmo” (Faulkner)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptadas 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 ILUSTRAÇÕES	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MATURITY-ONSET DIABETES OF THE YOUNG - GCK	3
1.1.1 O GENE <i>GCK</i>	4
1.2 MATURITY-ONSET DIABETES OF THE YOUNG - HNF1A	7
1.2.1 O GENE <i>HNF1A</i>	8
2 DIAGNÓSTICO GENÉTICO MOLECULAR: MÉTODOS E IMPORTÂNCIA	11
3 OBJETIVOS	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 CASUÍSTICA	15
4.1.1 COLETA, ARMAZENAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS	16
4.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	18
4.2 ANÁLISE GENÉTICO-MOLECULAR	19
4.2.1 COLETA, EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	20
4.2.1.1 Extração do DNA	21
4.2.1.2 Desenho dos Primers	22
4.2.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	23
4.2.1.4 Reação de Sequenciamento e Precipitação	24
4.2.2 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO	26
4.2.2.1 Avaliação das Variantes Alélicas Candidatas	27

4.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
<u>5 RESULTADOS</u>	<u>30</u>
5.1 DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS DA COORTE	30
5.2 INVESTIGAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR	31
5.2.1 MODY- <i>GCK</i>	31
5.2.2 MODY- <i>HNF1A</i>	33
5.3 PROBANDOS POSITIVOS E NEGATIVOS	38
5.4 ANÁLISE DE PATOGENICIDADE	40
<u>6 DISCUSSÃO</u>	<u>44</u>
6.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL	44
6.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR	45
<u>7 CONCLUSÕES</u>	<u>51</u>
<u>8 ANEXOS</u>	<u>52</u>
<u>9 REFERÊNCIAS</u>	<u>89</u>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Gene <i>GCK</i>	4
Figura 2 - Proteína glicoquinase (estrutura cristalográfica)	6
Figura 3 - Gene <i>HNF1A</i>	9
Figura 4 - Fator de transcrição HNF-1 α ligado ao DNA - destaque em azul e rosa (estrutura cristalográfica)	10
Figura 5 - Origem dos 109 probandos com suspeita clínica de MODY	16
Figura 6 - Fluxo de coleta, armazenamento e análise dos dados...	17
Figura 7 - Fluxograma do rastreamento genético-molecular de MODY	20
Figura 8 - Localização das variantes candidatas identificadas no gene <i>GCK</i>	31
Figura 9 - Localização das variantes candidatas identificadas no gene <i>HNF1A</i>	33
Figura 10 - Classificação final, segundo os critérios da ACMG/AMP, das variantes alélicas candidatas no gene <i>GCK</i>	40
Figura 11 - Classificação final, segundo critérios da ACMG/AMP, das variantes alélicas candidatas no gene <i>HNF1A</i>	41
Figura 12 - Transcritos alternativos do gene <i>HNF1A</i> e seus domínios proteicos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subtipos de <i>MODY</i> e seus respectivos genes	1
Tabela 2 - Transcritos - referência	22
Tabela 3 - Ferramentas utilizadas durante a análise do sequenciamento	26
Tabela 4 - Método de interpretação dos dados de cossegregação..	28
Tabela 5 - Testes estatísticos	29
Tabela 6 - Frequência alélica mínima (MAF) no 1.000 <i>Genomes Project Consortium</i> (1KGP) das variantes alélicas frequentes identificadas no gene <i>GCK</i>	32
Tabela 7 - Frequência alélica mínima (MAF) no 1.000 <i>Genomes Project Consortium</i> (1KGP) das variantes alélicas frequentes identificadas no gene <i>HNF1A</i>	33
Tabela 8 - Dados clínicos, laboratoriais e genéticos dos probandos com diagnóstico genético de <i>MODY</i>	35
Tabela 9 - Variantes alélicas candidatas identificadas durante a análise genética dos probandos com diagnóstico clínico de <i>MODY</i>	37
Tabela 10 - Comparação entre as características clínico-laboratoriais dos probandos com diagnóstico genético positivo e negativo	39
Tabela 11 - Classificação ACMG / AMP das variantes candidatas nos genes <i>GCK</i> e <i>HNF1A</i>	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Questionário MODY - Dados Clínico-laboratoriais - Casos Índices	52
Anexo B - Questionário MODY - Dados Clínico-laboratoriais - Rastreamento.....	71
Anexo C - <i>Primers</i> utilizados durante a investigação genético-molecular.....	82
Anexo D - Critérios de classificação da <i>The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and The Association for Molecular Pathology (AMP)</i>	83
Anexo E - Heredogramas	85
Anexo F - Artigo - <i>Clinical application of ACMG-AMP guidelines in HNF1A and GCK variants in a cohort of MODY families - Clinical Genetics</i>	88

RESUMO

Santana LS. *Análise genético-molecular integrada aplicada ao processo de investigação de pacientes com diagnóstico clínico de MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young)* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017

Introdução: O sequenciamento completo do genoma humano foi finalizado em 2003, tornando-se responsável por uma revolução na prática médica, geralmente referenciada como a era da genômica e da medicina personalizada. O aumento na demanda por testes genéticos e a introdução de novos métodos de sequenciamento em larga escala tem gerado um inevitável crescimento no número de variantes raras mapeadas. Tal fato levou à expansão de áreas do conhecimento necessárias, tanto para uma adequada avaliação do real significado clínico desses achados, como para uma indicação mais criteriosa da investigação genética. Devido a isso, torna-se necessário otimizar os processos, desde a seleção dos casos sob suspeita até a coleta, armazenamento e análise dos dados clínico-laboratoriais e moleculares obtidos, visando a uma melhor acurácia no diagnóstico, tratamento e aconselhamento genético. Uma obtenção e interpretação adequada dos achados genético-moleculares, aliados a critérios clínicos de seleção adequados, resultaria no que hoje constitui a análise genética multifatorial ou integrada. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo implementar a análise genético-molecular integrada ao processo de investigação de pacientes com diagnóstico clínico de MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*). **Materiais e métodos:** A prevalência dos dois subtipos mais frequentes de MODY (MODY-*GCK* e MODY-*HNF1A*) foi investigada em uma grande coorte de famílias brasileiras. Todas as variantes identificadas como relacionadas ao fenótipo foram criteriosamente classificadas quanto a suas reais evidências de patogenicidade por meio da implementação das mais recentes diretrizes de obtenção e interpretação de achados genéticos. **Resultados:** Cento e nove probandos foram investigados, 45% (49/109) com suspeita clínica de MODY-*GCK* e 55% (60/109) de MODY-*HNF1A*, além de 94 familiares, o que resultou

na identificação de 25 variantes únicas candidatas no gene *GCK* em 30 probandos (61% - 30/49), além de 7 em 10 indivíduos com suspeita de MODY-*HNF1A* (17% - 10/60). Dos 87 familiares sob risco rastreados, 43 eram portadores da mesma variante da família (37 - *GCK* e 6 - *HNF1A*). Um provável efeito fundador foi identificado com relação a uma deleção/inserção do tipo *frameshift*, presente em três probandos com MODY-*GCK* oriundos da mesma região do país. A implementação dos critérios da ACMG (*The American College of Medical Genetics and Genomics*) de avaliação de evidências de patogenicidade resultou na classificação de uma grande parcela das variantes como patogênica (36% - *GCK* / 86% - *HNF1A*) e provavelmente patogênica (44% - *GCK* / 14% - *HNF1A*), restando 16% com uma associação ainda incerta com o fenótipo investigado. Quatorze novas variantes foram identificadas (12 - *GCK* / 2 - *HNF1A*), ampliando, assim, o espectro de alterações associadas a MODY.

Conclusões: Esta abordagem investigativa nos permitiu não apenas esclarecer a etiologia genética de inúmeros casos com diagnóstico clínico de MODY, como também determinar a classificação de patogenicidade das variantes de uma maneira mais detalhada, reforçando, principalmente, a provável relação com o fenótipo dentre aquelas ainda não descritas.

Descritores: genética; genética médica; medicina molecular; endocrinologia, diabetes mellitus; diagnóstico.

ABSTRACT

Santana LS. *Integrated molecular genetic analysis applied to the investigation process of patients with clinical diagnosis of MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young)* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017

Introduction: The full sequencing of the human genome was completed in 2003, becoming responsible for a revolution in medical practice, generally referred to as the era of genomics and personalized medicine. The increase in demand for genetic testing and the introduction of new methods of large-scale sequencing has raised an inevitable growth in the number of mapped rare variants. This fact led to the expansion of areas of knowledge required for a proper evaluation of the real clinical significance of these findings, as to a more solid indication of genetic research. Because of this, it is necessary to optimize the processes, from the selection of cases under suspicion until the collection, storage and analysis of the clinical laboratory and molecular data obtained, aiming a better accuracy in diagnosis, treatment and genetic counseling. A proper collection and interpretation of the molecular genetic findings, coupled with clinical criteria for appropriate selection would result in what today is the multifactorial or integrated genetic analysis. **Objective:** This current study aimed to implement the integrated molecular genetic analysis to the investigation process of patients with clinical diagnosis of MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young). **Materials and methods:** The prevalence of the two most common MODY subtypes (MODY-*GCK* and MODY-*HNF1A*) was investigated in a large cohort of Brazilian families. All variants identified as related to the phenotype were carefully classified to their actual evidence of pathogenicity by implementing the latest guidelines for obtainment and interpretation of genetic findings. **Results:** 109 probands were investigated, 45% (49/109) with clinical suspicion of MODY-*GCK* and 55% (60/109) of MODY-*HNF1A*, plus 94 family members under risk, which resulted in the identification of 25 unique variants candidates in the gene *GCK* in 30 probands (61% - 30/49), and also 7 in 10 individuals with suspected MODY-

HNF1A (17% - 10/60). Of the 87 family members under risk, 43 were carriers of the same variant of the family (37 - *GCK* and 6 - *HNF1A*). A probable founding effect was identified, related to a frameshift deletion/insertion, present in three probands with MODY-*GCK* from the same region of the country. The implementation of the ACMG guidelines (The American College of Medical Genetics and Genomics) of evidence of pathogenicity assessment resulted in the classification of a large portion of the variants as pathogenic (36% - *GCK* / 86% - *HNF1A*) and likely pathogenic (44% - *GCK* / 14% - *HNF1A*), leaving 16% with a still uncertain association with the investigated phenotype. Fourteen new variants were identified (12 - *GCK* / 2 - *HNF1A*), broadening the spectrum of modifications associated to MODY. **Conclusions:** This investigative approach allowed us to not only clarify the genetic etiology of numerous cases with clinical diagnosis of MODY, as well as determine the pathogenicity classification of variants in a more detailed way, reinforcing the likely relationship with the phenotype among those not yet described.

Descriptors: genetics; genetics, medical; molecular medicine; endocrinology; diabetes mellitus; diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* compreende um grupo de alterações metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina e, ou sua ação (1).

A maioria dos casos de diabetes enquadram-se em quatro grandes categorias: tipo 1 (DM1); tipo 2 (DM2); gestacional e os outros tipos, que incluem os casos de diabetes de origem monogênica (2).

No diabetes monogênico o fenótipo é decorrente de alterações alélicas em *loci* específicos, sem tanta influência multifatorial como no caso do DM2. O subtipo mais prevalente deste grupo heterogêneo de formas hereditárias de diabetes é o *Maturity-Onset Diabetes of the Young* ou MODY (2,3).

MODY é uma forma de diabetes não autoimune com padrão de herança autossômico dominante e alta penetrância (95%). Representa cerca de 1%-2% de todos os casos de diabetes (4). Todos os 14 subtipos já descritos (tabela 1) se caracterizam por uma disfunção de células β associada a defeitos na secreção de insulina; história familiar de DM; ausência de auto anticorpos contra ilhotas pancreáticas; não dependência de insulina após o período de “lua-de-mel” e início do quadro clínico na infância ou adolescência (geralmente antes dos 25 anos de idade) (4–7).

Tabela 1 - Subtipos de MODY e seus respectivos genes

Gene	Subtipo	OMIM ID
<i>HNF4A</i>	MODY 1 / MODY <i>HNF4A</i> (8)	#125850
<i>GCK</i>	MODY 2 / MODY <i>GCK</i> (9)	#125851
<i>HNF1A</i>	MODY 3 / MODY <i>HNF1A</i> (10)	#600496
<i>PDX1</i>	MODY 4 / MODY <i>PDX1</i> (11)	#606392
<i>HNF1B</i>	MODY 5 / MODY <i>HNF1B</i> (12)	#137920
<i>NEUROD1</i>	MODY 6 / MODY <i>NEUROD1</i> (13)	#606394
<i>KLF11</i>	MODY 7 / MODY <i>KLF11</i> (14)	#610508
<i>CEL</i>	MODY 8 / MODY <i>CEL</i> (15)	#609812

Gene	Subtipo	OMIM ID
<i>PAX4</i>	MODY 9 / MODY <i>PAX4</i> (16)	#612225
<i>INS</i>	MODY 10 / MODY <i>INS</i> (17)	#613370
<i>BLK</i>	MODY 11 / MODY <i>BLK</i> (18)	#613375
<i>ABCC8</i>	MODY 12 / MODY <i>ABCC8</i> (19)	#125853
<i>KCNJ11</i>	MODY 13 / MODY <i>KCNJ11</i> (4)	#616329
<i>APPL1</i>	MODY 14 / MODY <i>APPL1</i> (20)	#616511

Uma análise genético-molecular é necessária para a confirmação do diagnóstico clínico de MODY, sendo importante não apenas para o manejo clínico, já que alguns subtipos possuem peculiaridades quanto ao tratamento e prognóstico, como também para um adequado aconselhamento genético (21).

Estudos em famílias de coortes europeias de países como Alemanha, França, Inglaterra e Espanha mostram uma prevalência variável dos diferentes subtipos de MODY e um predomínio marcante de MODY-*GCK* e MODY-*HNF1A*, que correspondem de 10%-60% e de 20%-65% dos casos, respectivamente (22).

Atualmente, mesmo com grandes esforços aplicados durante a investigação genética, que vão desde as intensivas análises de *linkage* até as triagens para a descoberta de novos genes candidatos por novos métodos de sequenciamento em larga escala, um grande número de pacientes com MODY ainda permanece com sua etiologia genética não esclarecida (*MODY-X*), com uma prevalência mundial de cerca de 15%-20% (23–25).

No Brasil, mesmo os subtipos mais frequentes de MODY (*GCK* e *HNF1A*) possuem uma baixa prevalência em comparação a outros países, com o percentual de casos não *GCK* / não *HNF1A* atingindo cerca de 70% (22).

Estimativas recentes destacam o Brasil como possuindo a quarta maior população com diabetes *mellitus* do mundo, com aproximadamente 14 milhões de indivíduos (26). Este dado nos permite estimar o número de casos de MODY no país em perto de 140.000-280.000. Até 2016, entretanto, cerca de 200 indivíduos provenientes de 50 famílias foram diagnosticados com os dois subtipos mais comuns (MODY-*GCK* e MODY-*HNF1A*) (7,22,27–35).

1.1 Maturity-Onset Diabetes of the Young - GCK

Variantes alélicas em heterozigose que comprometem a função do produto proteico (glicoquinase) do gene *GCK* levam ao desenvolvimento de MODY-*GCK* ou anteriormente denominado MODY 2. Neste subtipo os indivíduos, caracteristicamente, já possuem manifestações desde o nascimento, porém de maneira subclínica, sendo diagnosticados tipicamente durante a primeira infância (36).

O *GCK* foi o primeiro gene a ser associado ao fenótipo de MODY, durante a realização de estudos de ligação em famílias da França e do Reino Unido em 1992 (9,37). Após isso, mais de 600 variantes alélicas já foram relatadas como causadoras do fenótipo, sendo aproximadamente 70% do tipo *missense* (36,38). A maioria dos casos de MODY-*GCK* relatados concentram-se em basicamente três grandes populações: Reino Unido; França e Espanha (36).

Os indivíduos acometidos apresentam discreta elevação da glicemia de jejum (110 mg/dL-140 mg/dL) como resultado de mudança na curva de secreção de insulina mediada pela concentração plasmática de glicose (alteração do limiar de sensibilidade). A glicemia permanece regulada em concentrações levemente maiores do que as observadas em indivíduos não diabéticos (39). Os percentuais de hemoglobina glicada (HbA1c) variam, tipicamente, de 5,6%-7,6% e são tratados, de forma inapropriada, com insulina ou hipoglicemiantes orais, não resultando em melhora metabólica significativa (40).

Entre caucasianos, cerca de 2%-5% daqueles com diabetes *mellitus* gestacional possuem MODY-*GCK*, sugerindo prevalência de cerca de 0,04%-0,1%, na população geral (36). Em inúmeras coortes europeias, a mais estudada em relação ao fenótipo em questão, a prevalência de MODY-*GCK*, entre pacientes com suspeita clínica, variou de 10%-80% (36); por outro lado, na população brasileira esses números ficam entre 8%-12% (22,29). Essa grande discrepância observada ocorre principalmente devido à forma como os pacientes são recrutados nos diversos estudos realizados (36).

A real prevalência de MODY-*GCK*, entretanto, é difícil de ser estimada devido à hiperglicemia subclínica e a ausência de sintomas, o que leva a um frequente subdiagnóstico (36), contribuindo também para isso o difícil acesso a exames genéticos por grande parte da população (39).

1.1.1 O gene *GCK*

O gene *GCK* está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p15.3-p15.1) (figura 1). Com aproximadamente 45kb, possui 12 éxons e codifica uma proteína com 465 aminoácidos (41). O transcrito referência mais utilizado na literatura para a notação de variantes é o NM_000162 (RefSeq), devido à sua expressão tecido específica (pâncreas) (42).

Figura 1 - Gene *GCK*
 Transcrito referência NM_000162 (10 éxons – 2.729 pbs - Ensembl – versão 86)
 (43,44)

Sua expressão ocorre constitutivamente no fígado, pâncreas, cérebro e células endócrinas do trato digestório (41) e em contraste com os demais subtipos de MODY, as variantes em *GCK* acarretam um fenótipo brando e com poucas variações clínicas (36).

A presença de promotores específicos permite uma regulação e transcrição diferencial do gene, dando origem a três isoformas. A região promotora a *upstream* é funcional principalmente no pâncreas e no cérebro, enquanto o promotor *downstream* atua apenas no fígado (36).

O gene *GCK* codifica uma importante enzima regulatória pertencente à família das exoquinases, denominada glicoquinase. A glicoquinase (figura 2) possui um importante papel na regulação da secreção de insulina, catalisando a primeira reação da via glicolítica, a conversão de glicose em glicose-6-fosfato (34,41).

Tal enzima funciona como um sensor na célula beta-pancreática, controlando a taxa de entrada de glicose na via glicolítica e sua subsequente metabolização (5).

A geração de ATP oriunda da glicólise, e do ciclo de Krebs, leva à inibição e consequente fechamento dos canais de potássio ATP-dependentes, despolarização da membrana plasmática e abertura dos canais de cálcio, com influxo do cálcio extracelular e mobilização de seus estoques intracelulares. Essa via de sinalização culmina com a fusão dos grânulos de insulina com a membrana plasmática e a liberação do hormônio na circulação (5).

A estrutura cristalográfica da enzima humana foi detalhada em 2004 (45), o que contribuiu para a compreensão das consequências moleculares das diversas variantes já descritas. É estruturalmente composta por dois domínios separados por uma “fenda” na qual a molécula de glicose se liga (36).

Figura 2 - Proteína glicoquinase (estrutura cristalográfica)
Fonte: NCBI - *Molecular Modeling Database* (2016)

O número atual de variantes que afetam o produto proteico do gene *GCK* ultrapassa 600 já descritas (36) e possuem, como consequência, a alteração da cinética da glicoquinase, com a diminuição ou potencialização de sua atividade enzimática (5,46).

Quando presentes em heterozigose, tais variantes levam a uma deficiência parcial da enzima (MODY - variantes inativadoras - cerca de 500 já descritas) ou um aumento de sua atividade (hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar - variantes ativadoras), enquanto que em homozigose ocasionam um comprometimento completo da glicoquinase (diabetes *mellitus* neonatal permanente) (5,36,47).

Em indivíduos com MODY a diminuição da atividade enzimática prejudica a fosforilação da glicose na célula beta-pancreática, com consequente modificação da relação dose-resposta entre a concentração plasmática de glicose e a secreção de insulina. Nestes casos ocorre uma elevação na concentração de glicose necessária para estimular a liberação do hormônio, levando a um quadro de hiperglicemia basal e pós-prandial moderada não

progressiva (limitada devido a uma adaptação fisiológica da célula beta-pancreática) (5).

Não existem variantes com grande recorrência (exceto aquelas com comprovado efeito do fundador) ou presença de *hotspots*, entretanto um percentual significativo delas estão presentes em ilhas de dinucleotídeos CpG (42). Além disso, variantes *de novo* são um achado relativamente raro, com menos de 20 casos já descritos (42,48).

Um grande estudo publicado em 2014 demonstrou que o tratamento farmacológico com hipoglicemiantes orais ou insulina não possui a resposta terapêutica esperada em indivíduos com MODY-*GCK*, sendo um interessante exemplo no campo da farmacogenética, no qual o genótipo de um indivíduo determina sua resposta terapêutica (40).

A ausência de uma redução eficaz de HbA1c e glicemia nesses indivíduos pode ser explicada pelo fato de seu nível glicêmico ser regulado pela própria elevação da glicemia. Tal *feedback* fica evidente durante a realização do TOTG (Teste Oral de Tolerância a Glicose), no qual a glicemia rapidamente retorna a seu nível basal durante o jejum (49).

Devido a essa característica, quando uma pequena dose de insulina exógena é administrada, por exemplo, ocorre uma redução compensatória de sua secreção endógena, sem uma real redução da glicemia. O efeito farmacológico esperado só ocorreria caso uma dose suprafisiológica fosse utilizada (40).

1.2 Maturity-Onset Diabetes of the Young - HNF1A

O gene *HNF1A* teve seu *locus* mapeado, com posterior identificação de sua relação com o quadro clínico de MODY, entre 1995 e 1996 (10,50).

Indivíduos com MODY-*HNF1A* apresentam hiperglicemia sintomática desde a adolescência ou início da vida adulta (46). Quando comparados àqueles com MODY-*GCK*, possuem uma acentuada elevação na concentração de

glicose plasmática duas horas após sua administração (TOTG), com um incremento típico acima de 81 mg/dL (5,46).

Além disso, a hiperglicemia destes pacientes tende a piorar com o passar dos anos devido a uma diminuição da secreção de insulina secundária a uma elevação progressiva da taxa de apoptose das células β (51), resultando muitas vezes na utilização de insulina na evolução do paciente (5). Outras características clínicas marcantes incluem baixo limiar renal de glicose (52), baixa concentração plasmática de proteína C reativa (PCR) (53), níveis elevados de HDL (46) e uma excelente resposta terapêutica à sulfonilureia (54).

Devido ao quadro progressivo de piora metabólica, oriundo da diminuição constante da secreção de insulina, os pacientes tendem a desenvolver complicações típicas geralmente observadas em indivíduos com diabetes *mellitus* tipos 1 e 2, como problemas microvasculares, renais e oftalmológicos (5,46).

A penetrância do quadro clínico de MODY-*HNF1A* é crescente com a idade, sendo aproximadamente 63% aos 25 anos, 94% aos 50 e 99% aos 75 (55).

Variantes no fator de transcrição HNF-1 α são a causa mais frequente de MODY em diversas populações estudadas pelo mundo, como Reino Unido (25,56), Irlanda (57), Alemanha/Áustria (58), Suécia (59), Noruega (60), República Checa (61), França (62), Espanha (63,64), Estados Unidos (65), China (66), Japão (67,68) e Brasil (29,30).

1.2.1 O gene *HNF1A*

O gene *HNF1A* possui aproximadamente 23kb e está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q24.2) (figura 3). A literatura recomenda a utilização do maior transcrito referência (RefSeq) NM_000545 para a notação das variantes (42).

Figura 3 - Gene *HNF1A*
Transcrito referência NM_000545 (10 éxons – 3.442 bps - Ensembl – versão 86)
 (43,58)

Seu produto proteico é expresso em inúmeros tecidos como fígado, rins e pâncreas, possuindo caracteristicamente três isoformas (A, B e C), produto de um processamento diferencial do RNAm imaturo, sendo todas idênticas em sua extremidade 5' (62).

Tais isoformas possuem sua expressão controlada ao longo do desenvolvimento, sendo a *HNF1A* (A) predominantemente fetal; *HNF1A* (B), mais abundante no pâncreas adulto e a *HNF1A* (C), sem expressão diferencial (62,69).

O gene *HNF1A* codifica um fator de transcrição (figura 4) pertencente a um grande complexo regulatório que inclui outros genes já relacionados a MODY, como *HNF4A*, *PDX1* e *HNF1B*. Possui três principais domínios proteicos (dimerização; ligação ao DNA e transativação) (46).

O HNF-1 α em conjunto com HNF-1 β e HNF-4 α , constituem uma rede integrada de fatores de transcrição responsáveis por coordenar a expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e vida adulta. Desempenham um papel crucial na diferenciação e funcionamento da célula β , regulando a expressão do gene da insulina e, também, de outras proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo da glicose (5).

Possuem, ainda, influência no metabolismo da mitocôndria, regulação da biossíntese de lipoproteínas no tecido hepático e expressão do gene da proteína C reativa (*CRP*) (5,62).

Figura 4 - Fator de transcrição HNF-1 α ligado ao DNA - destaque em azul e rosa (estrutura cristalográfica)
NCBI - Molecular Modeling Database (2016)

Em uma revisão realizada em 2013, 414 diferentes variantes no gene *HNF1A* foram catalogadas em 1.247 famílias, sendo a maioria do tipo trocas pontuais e a minoria deleções ou inserções: 54,6% *missense*; 21,7% *frameshift*; 9,4% *nonsense*; 8,7% modificadoras de sítio de *splicing*; 1,9% em regiões promotoras; 2,4% deleções/inserções/duplicações *in frame* e apenas 1,2% deleções completas do gene (62).

De maneira diferente da maioria dos genes associados a MODY, o *HNF1A* possui um *hotspot* mutacional no éxon 4, que equivale a cerca de 10%-15% das variantes descritas, das quais a mais frequente é a duplicação de um nucleotídeo (c.864dup / p.Pro289Alafs*28) em um trato poli-C (46,70).

Variantes espontâneas, ou seja, *de novo*, são bastante raras em MODY-*HNF1A*; há menos de dez casos relatados até o momento (62).

2 DIAGNÓSTICO GENÉTICO MOLECULAR: MÉTODOS E IMPORTÂNCIA

Em MODY o estudo genético-molecular das regiões codificadoras e sítios canônicos de *splicing* é atualmente realizado utilizando um método de sequenciamento por inibição de síntese - Sanger *sequencing* (71), considerado o padrão ouro para a detecção dos tipos mais comuns de variantes genômicas (42).

A avaliação de variações de número de cópias (grandes deleções/duplicações) pode ser realizada pelo emprego da técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que quantifica cerca de 30-40 diferentes sondas específicas de DNA em apenas uma reação (42,72).

Como destacado anteriormente, durante a anotação das variantes identificadas, transcritos referência específicos devem ser utilizados para cada um dos genes. No caso do *GCK*, RefSeq - NM_000162, devido à expressão tecido específico, e do *HNF1A*, RefSeq - NM_000545, devido ao tamanho da isoforma (42).

A estratégia de investigação de pacientes com suspeita clínica pode variar de laboratório para laboratório, indo desde o sequenciamento simultâneo dos dois genes mais frequentemente relacionados (*GCK / HNF1A*), até a escolha do gene alvo de acordo com os critérios clínicos específicos de seleção. O rastreamento de familiares deve ser sempre planejado após o estabelecimento do diagnóstico genético do probando (42).

Em MODY-*GCK*, cujo risco de recorrência é de 50%, a realização de teste genético preventivo em crianças não é obrigatória, uma vez que a avaliação da glicemia de jejum pode ser utilizada como um método mais barato e rápido, ficando o estudo genético-molecular apenas para fins confirmatórios. No caso de casamentos consanguíneos entre indivíduos afetados existe o risco de 25% de herança da variante em homozigose, o que levaria a um quadro de diabetes *mellitus* neonatal permanente (46).

O aconselhamento genético em MODY-*HNF1A* (risco de recorrência de 50% na irmandade) possui a importância geral de permitir que os pais tomem

uma decisão informada. As vantagens na realização de um teste genético preventivo estão principalmente no monitoramento mais eficiente dos primeiros sintomas de um quadro diabético, já que o fenótipo possui uma penetrância variável em função da idade (46).

Desta maneira, a triagem genética em MODY auxilia a prática clínica de inúmeras formas, que incluem: 1) confirmação do diagnóstico clínico; 2) identificação de familiares portadores que necessitam de uma conduta clínica precoce e adequado aconselhamento genético e 3) identificação de familiares não portadores com exclusão do seguimento clínico (6,34,73).

Mais recentemente, novas abordagens de investigação, como o uso de plataformas de sequenciamento paralelo em larga escala, tem facilitado o estudo de dezenas de *loci* simultaneamente, propiciando a descoberta de subtipos mais raros da doença e de novos genes associados (74–79).

O aumento da demanda por testes genéticos aliado a estas novas tecnologias também vem gerando um inevitável crescimento no número de variantes raras mapeadas (80,81), expandindo áreas do conhecimento cruciais para sua correta interpretação.

Essa criteriosa e correta avaliação de achados genéticos vem ganhando grande destaque na comunidade científica, destacando-se a recente atualização das diretrizes de classificação de patogenicidade da ACMG/AMP (*The American College of Medical Genetics and Genomics / The Association for Molecular Pathology*) (82).

As investigações genético-moleculares, com propósito diagnóstico, tem se beneficiado cada vez mais desses avanços, uma vez que a realização de estudos funcionais de variantes alélicas, em modelos *in vivo* ou *in vitro*, tem se tornado impraticável devido ao grande número de *SNVs* (*Single-Nucleotide Variants*) detectados. Além disso, a especificidade e sensibilidade destes ensaios funcionais são muito variáveis, sendo sua utilização e interpretação limitadas (83).

Neste cenário, dependeremos cada vez mais da implementação de eficientes processos de obtenção e análise de dados genético-moleculares,

visando a uma melhor acurácia no diagnóstico precoce, crucial para um adequado tratamento e aconselhamento genético (6).

Sendo assim, a implementação de métodos mais eficientes de avaliação destes achados, com a atribuição de um adequado grau de patogenicidade às variantes encontradas, é imprescindível para qualquer rotina diagnóstica e um processo cada vez mais doença/gene-específico.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo implementar uma análise genético-molecular integrada (multifatorial) ao processo de investigação de pacientes com suspeita clínica de MODY, por meio da:

- 1) Construção e implementação de um sistema para coleta e armazenamento de dados clínicos-laboratoriais para triagem de pacientes referidos à confirmação genético-molecular do diagnóstico clínico de MODY.
- 2) Determinação da prevalência dos dois subtipos mais frequentes de MODY (MODY-*GCK* e MODY-*HNF1A*) na coorte brasileira selecionada.
- 3) Classificação criteriosa das variantes alélicas identificadas quanto a suas reais evidências de patogenicidade, com a implementação das mais recentes diretrizes de obtenção e interpretação de achados genéticos (*British Society for Genetic Medicine* e *The American College of Medical Genetics and Genomics / The Association for Molecular Pathology – ACMG/AMP*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido seguindo os princípios éticos e orientações contidas na declaração de Helsinki e os termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os indivíduos geneticamente investigados, ao serem convidados para participarem do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o número #70637 (**“Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico”**)

4.1 Casuística

Cento e nove probandos com suspeita clínica de MODY foram encaminhados ao Grupo de Diabetes Monogênico da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), por meio de transferências ambulatoriais internas ou encaminhados, por meio de um formulário eletrônico (disponível em **www.diabetesgeneticousp.com**) (84), por serviços externos.

Pacientes oriundos de 4 das 5 regiões brasileiras compõem a coorte avaliada (Figura 5), e cerca de 40% destes são atualmente acompanhados no Ambulatório de Diabetes Monogênico do HCFMUSP.

Figura 5 - Origem dos 109 probandos com suspeita clínica de MODY
 Cada cor indica uma das cinco regiões brasileiras: Azul - Sul (6 casos);
 Vermelho - Sudeste (89 casos); Amarelo - Centro-Oeste (3 casos); Laranja -
 Nordeste (11 casos) e Verde - Norte (nenhum caso)

4.1.1 Coleta, Armazenamento e Análise dos Dados Clínico-Laboratoriais

Para a implementação do sistema de coleta e armazenamento dos dados clínico-laboratoriais de pacientes com suspeita clínica de MODY, especialmente aqueles encaminhados por serviços externos, foi implementada a plataforma de *Cloud Computing* do Google (**G Suite**), mais especificamente os serviços:

- Gmail – Centralizar a comunicação entre o grupo e seus colaboradores;

- Google Formulários – Coleta dos dados clínico-laboratoriais dos casos encaminhados ao serviço;
- Google Docs – Armazenamento e tratamento dos dados clínico-laboratoriais obtidos.

A figura 6 esquematiza o fluxo de coleta e armazenamento de dados empregado. Além disso, um endereço eletrônico foi criado (diabetesgeneticousp.com) de modo a facilitar a disseminação, entre possíveis colaboradores, do trabalho desenvolvido bem como de detalhes específicos sobre a pesquisa.

* Os dados podem ser exportados para [Microsoft Excel / PDF](#)

Acesso às informações limitado aos integrantes do grupo (acesso protegido por verificação em duas etapas)

Figura 6 - Fluxo de coleta, armazenamento e análise dos dados

Foram elaborados dois questionários eletrônicos, o primeiro para o encaminhamento de casos índices e o segundo para seus familiares sob risco (anexos A e B), ambos contendo perguntas-chave relacionadas aos aspectos clínicos e laboratoriais mais relevantes para o diagnóstico de MODY: idade de início e grau da hiperglicemia ao diagnóstico e no seguimento (glicemia de jejum e HbA1c); presença ou não de história familiar de DM; peso e altura ao diagnóstico; dosagens de anticorpos anticélula β ; peptídeo C e ainda presença ou não de manifestações extrapancreáticas.

Um endereço eletrônico foi atribuído a cada formulário, sendo disponibilizado no endereço do grupo e permitindo seu fácil acesso a partir de qualquer dispositivo eletrônico como computador; *tablet* ou *smartphone*.

A solicitação para a realização do teste genético deve apenas ser realizada pelo médico do paciente.

4.1.2 Critérios de Inclusão

Os critérios de avaliação (46,85) aplicados aos dados clínico-laboratoriais anteriormente coletados, visando à inclusão, ou não, do paciente no estudo, foram divididos em dois grandes grupos:

- Critérios que indicam uma suspeita clínica de MODY (subtipo não específico)
- Critérios que indicam uma suspeita clínica de MODY-subtipo específico (*GCK* ou *HNF1A*)

Cada paciente foi, então, inicialmente avaliado quanto aos critérios gerais de inclusão, ou seja, àqueles que levam à suspeita de MODY, sendo:

- Idade de início do diabetes antes dos 35 anos em pelo menos um indivíduo da família;
- História familiar de diabetes em, pelo menos, duas gerações consecutivas do mesmo lado da família;
- Paciente não obeso e sem sinais de resistência insulínica;
- Anticorpos anticélula β negativos;
- Peptídeo C detectável fora da fase de “lua-de-mel” (período após o diagnóstico de DM tipo 1 em que ainda há secreção endógena de insulina, podendo durar de 3-5 anos).

É importante destacar que o paciente não precisa, necessariamente, preencher todos os critérios para ser referido para a pesquisa. O uso de critérios

clínicos menos rígidos para o diagnóstico de MODY pode permitir um aumento do número de casos diagnosticados (85).

Com base nisso, os critérios mínimos de inclusão utilizados foram: peptídeo C detectável (fora da fase de “lua-de-mel”) e anticorpos negativos, e aqueles que poderiam sofrer algum afrouxamento (quando em casos muito sugestivos): idade de início do diabetes, história familiar positiva e presença de obesidade/sobrepeso ao diagnóstico.

Após esta avaliação inicial, foram observadas as características sugestivas dos dois subtipos de MODY:

- Hiperglicemia leve, com evolução não progressiva (MODY-*GCK*)
- Ausência de tratamento do diabetes sem descompensação metabólica (MODY-*GCK*)
- Controle glicêmico com baixas doses de sulfonilureia (MODY-*HNF1A*)

Essa abordagem se faz necessária devido às características marcantes de cada um dos subtipos citados, norteando, assim, a análise genético-molecular posterior.

Após a seleção e obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, amostras de sangue periférico foram obtidas de todos os probandos e de seus familiares disponíveis.

4.2 Análise Genético-Molecular

A figura 7 ilustra de maneira resumida o fluxograma de rastreamento genético-molecular empregado na avaliação das famílias que preencheram os critérios clínico-laboratoriais de seleção (72,86–88).

Em todas as etapas possíveis (descritas na figura 7) buscou-se empregar as recomendações ratificadas pela *UK Clinical Molecular Genetics Society / Dutch Society of Clinical Genetic Laboratory Specialists* e recentemente

atualizadas pela *Clinical Molecular Genetics Society and Association of Clinical Cytogenetics / Dutch Society of Clinical Genetic Laboratory Specialists* (83).

O texto basicamente detalha boas práticas em análise genético-molecular, visando à obtenção dos melhores resultados bem como sua correta interpretação, destacando sempre o que é **aceitável**, **recomendável** e **essencial** em uma rotina laboratorial diagnóstica.

Figura 7 - Fluxograma do rastreamento genético-molecular de MODY

4.2.1 Coleta, Extração, Amplificação e Sequenciamento

Foram obtidas amostras de sangue periférico, por punção venosa, em dois tubos de coleta de 5mL, contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

4.2.1.1 Extração do DNA

Durante a realização dos procedimentos práticos utilizou-se um método *in house* (89) para obtenção de DNA a partir de amostras de sangue total periférico, além de um *kit* comercial para a purificação do material genômico extraído com baixa qualidade. Ambos serão descritos com maiores detalhes nos tópicos seguintes.

4.2.1.1.1 Método de *Salting-out* (*in house*)

Um dos obstáculos durante a extração de DNA é o incômodo método de desproteínização do lisado celular. Um procedimento rápido, seguro e barato foi desenvolvido para simplificar esse processo. O método envolve o *salting-out* de proteínas celulares por desidratação e precipitação em uma solução de NaCl saturada (86).

O método utilizado foi dividido em duas etapas. A primeira iniciou-se com a transferência do sangue total homogeneizado para um tubo *falcon*. A partir daqui realizaram-se três ciclos de lavagem do material utilizando um tampão (1X) para lise eritrocitária denominado A (carbonato de amônia e cloreto de amônia). Os ciclos de lavagem eram compostos pelas seguintes etapas: adição de 20mL do tampão A 1X; incubação no gelo por 10min; centrifugação por 10min a 11.000 rpm a 4°C e, por fim, o descarte do sobrenadante.

Após a realização do terceiro e último ciclo de lavagem, a primeira etapa do método foi finalizada.

A segunda etapa envolveu basicamente a lise celular e sua desproteínização. Ao *pellet* obtido na primeira etapa, acrescentou-se 3mL de tampão de lise; 500µL de tampão C (SDS e EDTA) e 4µL de proteinase K.

A solução obtida foi, então, incubada por duas horas a 65 °C. Após o período de incubação adicionou-se 1mL de NaCl 6M. Agitou-se o conteúdo em

vórtex por 3min, posteriormente centrifugando-o a 22 °C por 20min, a 11.000 rpm.

Após a centrifugação, verteu-se o sobrenadante em tubo *falcon* previamente preparado com 8mL de etanol absoluto gelado. Esperou-se, então, a precipitação do DNA. O material extraído foi transferido, com o uso de uma pipeta, para um tubo *eppendorf®* contendo 500µL de TE 1X.

Antes de o material ser utilizado para os demais procedimentos, precisou permanecer em banho-maria a 65 °C, por 30min.

A pureza do material genômico extraído foi verificada no espectrofotômetro *NanoVue®* (*GE Health Care Life Sciences®*).

4.2.1.2 Desenho dos Primers

A investigação genética em MODY foi realizada, amplificando toda a região codificadora do gene candidato (*GCK* ou *HNF1A*) previamente selecionado durante a triagem clínica dos pacientes.

Os pares de *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta *Primer-BLAST* (90) com base, especificamente, nos seguintes transcritos referência (43):

Tabela 2 - Transcritos - referência

Gene	Transcrito RefSeq	Pbs	Proteína
<i>GCK</i>	NM_000162	3442	631 aa
<i>HNF1A</i>	NM_000545	2729	465 aa

O anexo C reúne a sequência de todos os pares de *primers* utilizados e o tamanho de seus respectivos fragmentos gerados.

4.2.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

O primeiro passo foi realizar a diluição de cada um dos *primers* liofilizados (*forward* e *reverse*) (Invitrogen®) para uma solução estoque com concentração de 100pM e, a partir desta, a preparação de uma solução de trabalho com concentração de 10pM. Desta forma, utilizamos 10µL da solução estoque a 100pM e 90µL de água deionizada ultrapura (*Direct-Q UV3®*) para obtermos uma solução de trabalho de 100µL a 10pM.

Após a preparação dos *primers*, foi necessário estabelecer os demais parâmetros para a realização da *PCR*. Em primeiro lugar determinamos, no termociclador (*Bioer LifeTouch®*), a quantidade de ciclos necessários e suas variações temporais e térmicas: (1) 95 °C por 15min; (2) 95 °C por 45s; **(3) 62 °C (GCK) / 56 °C (HNF1A)** por 30s; (4) 72 °C por 1min (as etapas 2 a 4 foram repetidas 35 vezes - ciclos); (5) 72 °C por 10min e (6) 10 °C - ∞.

Com os parâmetros do termociclador devidamente ajustados, partiu-se para a preparação da mistura de amplificação. Foi utilizado o seguinte protocolo, com volume final de 15µL, constituído por: 5µL de *buffer* 10X (*Promega®*); 2µL de *DNA*; 1 µL do primer *forward*; 1µL do primer *reverse*; 1µL de dNTPs (10 nM) (*Thermo Scientific®*); 1µL de MgCl₂ (50 nM) (*Life Technologies™*); 1µL de DMSO (*Sigma-Aldrich®*); 0,25µL de Go Taq DNA polymerase (*Promega®*) e 16,75µL de água ultrapura (*Direct-Q UV3®*).

Em seguida submeteu-se a mistura ao programa de termociclagem previamente configurado, sendo o produto obtido desta *PCR* (*amplicon*) analisado em eletroforese em gel de agarose.

4.2.1.3.1 Eletroforese

A verificação da presença e qualidade dos produtos de *PCR* gerados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o intercalador *Blue Green Loading Dye I* (*LGC Biotecnologia®*) e comparados com o marcador de peso molecular de 100pb (*DNA Ladder - Invitrogen®*). O gel foi submetido a uma diferença de potencial (DDP) de acordo com protocolo descrito por Sambrook (2001) (89) durante 40min, com posterior exposição à luz ultravioleta (*Loccus Biotecnologia*) para visualização e comparação das bandas.

4.2.1.3.2 Purificação

Os produtos da *PCR* que apresentaram especificidade quanto ao tamanho do fragmento esperado, foram purificados com o uso do *kit illustra™ ExoStar™ 1-Step* (*GE Healthcare Life Sciences®*). Para cada 5µL do produto de *PCR* adicionou-se 2µL de *illustra™ ExoStar™ 1-Step* (*GE Healthcare Life Sciences®*). A mistura obtida foi submetida ao seguinte ciclo no termociclador (*Bioer LifeTouch®*): (1) 37 °C por 15min e (2) 80 °C por 15min, em que (1) equivale à etapa para ação enzimática e (2), para sua inativação.

4.2.1.4 Reação de Sequenciamento e Precipitação

Com os produtos da *PCR* purificados em mãos, partiu-se para o sequenciamento gênico pelo método de inibição de síntese (71). Para isso utilizou-se o *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Life Technologies™*).

As reações foram realizadas com um volume final de 10 μ L, contendo 3 μ L do produto de *PCR* purificado, 1 μ L de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Life Technologies™*), 1 μ L do *primer forward* ou *reverse* (10pmol) e 2 μ L de tampão de sequenciamento (5X) (*Life Technologies™*), completando, assim, o volume final para 10 μ L com água ultrapura (*Direct-Q UV3®*).

Os *mix* foram, então, submetidos ao seguinte programa de termociclagem: (1) 95 °C por 10s; (2) 55°C por 15s; (3) 60°C por 1min; as etapas (2) e (3) foram repetidas 25 vezes (ciclos); (4) 10°C - ∞ .

Após o adequado sequenciamento das amostras, estas precisaram ser submetidas a um processo de precipitação que precede a eletroforese capilar.

Para cada amostra contendo 10 μ L de reação de sequenciamento acrescentamos 25 μ L de etanol 100% (*Merck®*) (não gelado), 1 μ L de Acetato de Sódio (*in house*) (3M) e 1 μ L de EDTA (*in house*) (125mM). Homogeneizou-se no vórtex e, após um rápido *spin*, incubou-se por 15min em temperatura ambiente e protegido da luz.

As amostras foram, então, centrifugadas por 45 minutos a 4.200rpm a 4 °C, com o posterior descarte do sobrenadante. Acrescentaram-se, a seguir, 35 μ L de etanol 70% (não gelado), homogeneizamos no vórtex e centrifugamos novamente a 4.200rpm por mais 15min a 4°C. Essa etapa de lavagem foi repetida mais uma vez.

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas a 95 °C por 5min em banho seco (*FINEPCR Dual Thermo Bath®*).

A eletroforese capilar foi então realizada com o Sequenciador *ABI Prism 3130XL* (16 capilares) (*Applied Biosystems®*).

4.2.2 Análise do Sequenciamento

A análise dos eletroferogramas obtidos foi realizada por meio de um conjunto de ferramentas de bioinformática (tabela 3) que incluiu desde o *software* para leitura dos dados provenientes do sequenciamento até servidores baseados na *web* para avaliação genético-molecular *in silico*.

Tabela 3 - Ferramentas utilizadas durante a análise do sequenciamento

Ferramenta	Característica
<i>Sequencher</i> (GENECODES®)	<i>software</i> para leitura e edição de eletroferogramas
<i>MutationTaster</i> (91)	avaliação <i>in silico</i> do impacto funcional de variantes alélicas
<i>PolyPhen-2</i> (92)	avaliação <i>in silico</i> do impacto funcional de variantes alélicas
<i>MutationAssessor</i> (93)	avaliação <i>in silico</i> do impacto funcional de variantes alélicas
<i>SIFT/PROVEAN</i> (94)	avaliação <i>in silico</i> do impacto funcional de variantes alélicas
<i>Human Splicing Finder</i> (95)	avaliação <i>in silico</i> de modificações em sítios de <i>splicing</i>
<i>BDGP</i> (96)	avaliação <i>in silico</i> de modificações em sítios de <i>splicing</i>
<i>CRYP-SKIP</i> (97)	avaliação <i>in silico</i> de modificações em sítios de <i>splicing</i>
<i>dbSNP</i> (98)	banco de dados genético-molecular
<i>Ensembl</i> (43)	banco de dados genético-molecular
<i>HGMD</i> (73)	banco de dados genético-molecular
<i>Exome Aggregation Consortium</i> (99)	banco de dados genético-molecular

4.2.2.1 Avaliação das Variantes Alélicas Candidatas

Todas as variantes alélicas identificadas durante a avaliação genético molecular dos pacientes com suspeita clínica de MODY, potencialmente candidatas a uma associação causal com o fenótipo, foram classificadas quanto ao seu grau de patogenicidade de acordo com os critérios de avaliação publicados pelo *The American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) and *The Association for Molecular Pathology* (AMP) (82).

O *guideline* redigido pela ACMG/AMP é constituído por um conjunto de critérios envolvendo quatro campos principais de avaliação: **dados populacionais; dados computacionais e preditivos; dados funcionais e análise de cossegregação**. Para cada variante, em cada um destes critérios, atribuiu-se um código com peso definido (anexo D). Ao final todos os códigos são combinados e um grau de patogenicidade final é atribuído à variante.

Resumidamente, existem duas maneiras de relacionar uma variante com um determinado fenótipo. A primeira delas possui como intuito corroborar uma relação causal genótipo-fenótipo, para isso o seguinte conjunto de códigos de **patogenicidade** é utilizado: PVS1 (muito forte); PS1/PS2/PS3/PS4 (forte); PM1/PM2/PM3/PM4/PM5/PM6 (moderado) e PP1/PP2/PP3/PP4/PP5 (corroborante).

A segunda possui como intuito comprovar uma relação genótipo-fenótipo casual, utilizando para isso o seguinte conjunto de códigos de **benignidade**: BA1 (*stand-alone*); BS1/BS2/BS3/BS4 (forte) e BP1/BP2/BP3/BP4/BP5/BP6/BP7 (corroborante).

O conjunto de códigos atribuídos a uma determinada variante é, então, utilizado para classificá-la quanto a sua evidência de patogenicidade em um sistema com cinco níveis: patogênica; provavelmente patogênica; significado incerto; provavelmente benigna e benigna.

Para auxiliar a interpretação dos dados oriundos das análises de cossegregação familiar foi agregado à diretriz da ACMG/AMP um método matemático de quantificação desenvolvido por Jarvik *et al.*, (2016) (100).

O modelo proposto é completamente integrado aos critérios da ACMG/AMP, com pontos de corte bem definidos em relação à interpretação dos dados de cossegregação. O resultado obtido expressa a probabilidade de a cossegregação ocorrer se a variante não for patogênica, utilizando para isso o número de meioses informativas. Uma vantagem deste método é que múltiplos indivíduos afetados de diferentes famílias, com a mesma variante, podem ser combinados para obtenção de um número único de meioses informativas.

A tabela 4 resume os pontos de corte e interpretação aplicados.

Tabela 4 - Método de interpretação dos dados de cossegregação
Probabilidade (N)

Evidência	Probabilidade (N)			
	1 família	Meioses**	>1 família	Meioses
Forte	$\leq 1 / 32$	5	$\leq 1 / 16$	4
Moderada	$\leq 1 / 16$	4	$\leq 1 / 8$	3
Corroborante	$\leq 1 / 8$	3	$\leq 1 / 4$	2

N: probabilidade de cossegregação se a variante não for patogênica

**** número mínimo de meioses necessárias**

Para a aplicação do método de Jarvik *et al.*, (2016) (100) devemos assumir que o(s) probando(s) possuem a variante com 100% de penetrância e que o alelo em questão é raro o suficiente para que todas as suas ocorrências sejam por descendência, descartando a hipótese de entrada da variante na família por mais de um ancestral.

Desta maneira, sob um modelo de herança autossômico dominante, a probabilidade de a variante cossegregar com o fenótipo, apenas por acaso, será de $N = (\frac{1}{2})^m$, em que m é o número de meioses informativas da variante de interesse.

Exemplo: em uma família possuímos três filhos afetados, portadores da variante, sendo um deles o probando, com o único parental afetado já falecido e sem dados de genotipagem. Como assumimos que o probando é portador da variante, existem apenas mais duas meioses informativas a serem consideradas (seus irmãos). Sendo assim, temos que $N = (\frac{1}{2})^2 = 1/4$ (probabilidade de cossegregação com o fenótipo se a variante não for patogênica). Devemos

destacar que o resultado não é $1/8$, pois a probabilidade de o probando possuir a variante já é igual a 1.

No exemplo utilizado, a probabilidade obtida não atinge o ponto de corte mínimo de $1/8$, quando dados são oriundos de apenas uma família, não representando uma evidência de patogenicidade a ser considerada, segundo os critérios da ACMG/AMP. Entretanto, se o mesmo valor $N (1/4)$ fosse obtido, utilizando dados de meioses informativas oriundos de duas ou mais famílias, possuiríamos uma evidência mínima de patogenicidade (corroborante), demonstrando a importância da recorrência de variantes em famílias geneticamente não relacionadas.

4.3 - Análise Estatística

Os dados foram inicialmente divididos em quantitativos (paramétricos ou não paramétricos, a depender da análise de suposição de normalidade) e qualitativos. Posteriormente, foi realizada a aplicação de teste estatístico adequado e interpretação dos valores obtidos de acordo com o limiar de significância estabelecido para a hipótese alternativa (tabela 5). Todas as análises foram realizadas por meio do *software* R (101).

Dados	Tabela 5 - Testes estatísticos Testes	Hipótese alternativa
Paramétricos	<i>Student's' t Test</i>	$p < \text{nível de significância}$ $\alpha = 0,05$
Não paramétricos	<i>Wilcoxon signed-rank test</i>	
Qualitativos	<i>Pearson's Chi-squared test</i>	

5 RESULTADOS

5.1 Dados Clínico-Laboratoriais da Coorte

Dos 124 formulários eletrônicos avaliados, 15 casos foram excluídos por não preencherem os critérios mínimos de inclusão utilizados.

Cento e nove probandos (60 do gênero masculino e 49 do gênero feminino) com suspeita clínica de MODY foram encaminhados (ou tiveram suas amostras de sangue enviadas) ao Laboratório de Investigação Médica 25 da Unidade de Endocrinologia Genética para estudo genético-molecular. Destes, 45% (49/109) preencheram os critérios clínicos específicos de MODY-*GCK* e 55% (60/109), os de MODY-*HNF1A*.

Os probandos do grupo selecionado para análise do gene *GCK* (49/109) apresentaram o seguinte perfil clínico-laboratorial ao diagnóstico [mediana (intervalo)]: idade ao diagnóstico - 11 anos (1-36); glicemia de jejum - 118 mg/dL (90-142); HbA1c - 6,3% (5,2-7,6); peptídeo C - 1,6 ng/mL (0,57- 3,6) e um incremento [(glicemia 2h) - (glicemia de jejum)] no TOTG de 37 mg/dL (0-258). Cinco pacientes referiram obesidade/sobrepeso ao diagnóstico.

Dentre aqueles selecionados para análise do gene *HNF1A* (60/109), o seguinte perfil clínico-laboratorial ao diagnóstico foi observado [mediana (intervalo)]: idade ao diagnóstico - 20 anos (1-42); glicemia de jejum - 200 mg/dL (99-525); HbA1c - 9,0% (5,7-13,0); peptídeo C - 1,8 ng/mL (0,4-3,8) e um incremento [(glicemia 2h) - (glicemia de jejum)] no TOTG de 109 mg/dL (0-147) (disponível em nove pacientes). Dois pacientes referiram obesidade/sobrepeso ao diagnóstico.

5.2 Investigação Genético-Molecular

5.2.1 MODY-GCK

Foram identificadas 28 diferentes variantes durante a análise do gene *GCK* no grupo sob suspeita. Três delas estavam localizadas fora da região codificadora e apresentavam uma elevada frequência populacional, sendo então descartadas (tabela 6). Os éxons 7 e 9 foram os que apresentaram o maior número de alterações (40%).

Vinte e cinco variantes (figura 8) foram, então, selecionadas como potencialmente responsáveis pelo fenótipo de MODY-*GCK*, estando presentes em 30 dos probandos investigados (30/49 - 61%) (tabela 8).

Figura 8 - Localização das variantes candidatas identificadas no gene *GCK*

Tabela 6 - Frequência alélica mínima (MAF) no 1.000 *Genomes Project Consortium* (1KGP) das variantes alélicas frequentes identificadas no gene *GCK*

Região (éxon / íntron)	Variante (ID)	MAF (1KGP)
Éxon 1 (5' UTR)	rs13306391	6,2%
Íntron IVS9	rs2908274	38%
Íntron IVS9	rs13306387	6%

Este grupo de 25 variantes (tabela 9) é composto por 18 *missense*, 3 deleções *frameshift*, 2 modificações em sítio de *splicing*, 1 duplicação *frameshift* e 1 rearranjo complexo (deleção / inserção), das quais 12 não foram descritas até o momento na literatura científica. As seguintes variantes *missense* c.571C>T / p.Arg191Trp, c.764C>T / p.Thr255Ile, c.1268T>A / p.Phe423Tyr e o rearranjo complexo c.[1135_1154delGCGCACATGTGCTCGGCGGG; 1134_1135insCTCATCAAC] foram identificadas em mais de uma família.

Rastreamento genético foi realizado nos 70 familiares disponíveis, dos quais 37 apresentaram a mesma variante identificada no probando de sua família (heredogramas - anexo E).

Em 25 famílias (83% - 25/30) o trio estava disponível para avaliação, nos quais foi possível identificar três casos isolados (variantes *de novo*), com paternidade/maternidade confirmada.

O perfil clínico-laboratorial ao diagnóstico dos probandos que apresentaram alguma das 25 variantes candidatas no gene *GCK* é apresentado na tabela 8. Tais pacientes apresentaram os seguintes dados durante o seguimento clínico [mediana (intervalo)]: glicemia de jejum - 118 mg/dl (95-152) e HbA1c - 6,4% (5,6-7,2).

5.2.2 MODY-HNF1A

Dezoito diferentes variantes foram identificadas durante o sequenciamento do gene *HNF1A*. Onze delas apresentaram uma elevada frequência populacional e foram descartadas (tabela 7).

Sete variantes raras (figura 9), presentes em 17% dos probandos investigados (10/60) (tabela 8), foram selecionadas como potencialmente responsáveis pelo fenótipo de MODY-HNF1A.

Figura 9 - Localização das variantes candidatas identificadas no gene *HNF1A*

Tabela 7 - Frequência alélica mínima (MAF) no 1.000 *Genomes Project Consortium* (1KGP) das variantes alélicas frequentes identificadas no gene *HNF1A*

Região (éxon / íntron)	Variante (ID)	MAF (1KGP)
1	rs1169289 / rs1169288 rs1800574	42% / 29% / 2%
Íntron IVS2	rs1169301	31%
4	rs56348580	18%
7	rs2259820 / rs2464196 /	31% / 31%
Íntron IVS7	rs2464195 / rs2259816	36% / 36%

Região (éxon / íntron)	Variante (ID)	MAF (1KGP)
8	rs55834942	6%
9	rs1169305	1,5%

Este grupo de 7 variantes (tabela 9) é composto por 3 *missense*, 2 *nonsense*, 1 duplicação *in frame* e 1 duplicação *frameshift*, das quais 2 não foram descritas até o momento na literatura científica. A duplicação *frameshift* c.872dupC / p.G292Rfs*25 foi identificada em quatro famílias.

Rastreamento genético foi realizado nos 17 familiares disponíveis, dos quais 6 apresentaram a mesma alteração identificada no probando de sua família (heredogramas - anexo E).

Em apenas uma família (10% - 1/10) o trio estava disponível para avaliação, no qual comprovou-se a herança paterna da variante.

O perfil clínico-laboratorial ao diagnóstico dos probandos que apresentaram alguma das sete variantes candidatas no gene *HNF1A* é apresentado na tabela 8. Tais pacientes apresentaram os seguintes dados durante o seguimento clínico [mediana (intervalo)]: glicemia de jejum - 124 mg/dl (70-349) e HbA1c - 6,4% (5,2-11,7).

Tabela 8 - Dados clínicos, laboratoriais e genéticos dos probandos com diagnóstico genético de MODY

Probando	Variante	Idade ao diagnóstico clínico ^a /idade ao diagnóstico genético (anos)	Peso referido ao diagnóstico ^b	História familiar de diabetes/HLJ (G/R/HT) ^c	Tratamento ao diagnóstico	Tratamento atual	Intervalo GJ ^d (mg/dL) seguimento	Intervalo HbA1c ^e (%) seguimento	Peptídeo-C ^f (ng/mL) seguimento	Complicações microvasculares
GCK-1	c.483+2T>C ^g	5/9	Baixo	2/2/0**	Dieta	Dieta	95–116	6,2–6,7	1,2	NR
GCK-2	p.Phe423Tyr ^h	9/12	Normal	2/2/1	Metformina	Dieta	101–121	6,0–6,3	1,0	Não
GCK-3	p.Arg191Trp ^g	32/33	Normal	1/NR/ND	Inibidor de DPP-4	ND	113–126	6,7–7,0	ND	Não
GCK-4	c.580-3C>A ⁱ	6/10	Baixo	2/2/1	Dieta	Dieta	125–138	6,3–6,7	1,8	ND
GCK-5	c.[1135_1154del; 1134_1135ins9] ^g	2/4	Sobrepeso	3/NR/ND	Sulfonilureia	Dieta	126–137	6,4–6,6	0,6	Não
GCK-6	p.Arg191Trp ^g	14/27	Baixo	4/14/10	Dieta	Dieta	98–124	5,9–6,6	1,2	Não
GCK-7	p.His416Profs*15 ^g	1/18	Normal	3/NR/ND	Dieta	ND	124–136	6,9–7,2	2,3	ND
GCK-8	p.Ile110Serfs*6 ^g	4/8	Normal	1/2/0**	Dieta	Dieta	109–130	5,7–7,1	0,7	Não
GCK-9	p.Gln138Pro ^h	6/7	Normal	2/2/1	Dieta	Dieta	110–114	6,0–6,1	1,2	Não
GCK-10	p.Phe423Tyr ^h	12/16	Normal	2/NR/ND	Dieta	Dieta	112–120	5,6–6,6	1,6	ND
GCK-11	p.Gly264Asp ^h	9/12	Baixo	2/3/2	Dieta	ND	109–110	5,9–6,5	0,8	ND
GCK-12	p.Glu221Lys ^h	4/7	Normal	3/7/4	Dieta	ND	118–123	6,5–6,9	2,1	Não
GCK-13	p.Glu256Ala ^h	30/49	Normal	3/2/2	Dieta	Metformina*	102–134	6,5–6,9	1,6	Não
GCK-14	p.Met37Thr ^j	16/19	Normal	2/1/1	Dieta	ND	115–134	6,4–7,0	2,5	Não
GCK-15	p.Lys169Glu ⁱ	4/42	Baixo	2/2/1	Dieta	Dieta	110–120	6,4–6,8	1,6	Não
GCK-16	p.Thr255Ile ^h	5/9	Sobrepeso	2/3/2	Dieta	ND	99–117	5,8–6,6	1,0	ND
GCK-17	p.Gly72Arg ^g	11/15	Normal	2/2/1	Dieta	ND	112–128	6,0–6,8	2,4	Não
GCK-18	p.Thr206Met ^g	14/18	Normal	2/2/0**	Dieta	Dieta	110–122	6,2–6,4	2,1	ND
GCK-19	p.Lys140Glu ^h	3/11	Sobrepeso	3/6/3	Dieta	Dieta	108–117	5,9–6,3	1,1	ND
GCK-20	p.Ala384Val ^h	4/11	Normal	2/2/1	Dieta	ND	124–136	6,5–6,8	1,4	Não
GCK-21	p.Arg447Gln ^h	11/14	Normal	2/2/1	Dieta	Dieta	110–121	6,1–6,4	3,2	ND
GCK-22	c.[1135_1154del; 1134_1135ins9] ^g	3/5	Normal	2/NR/ND	Dieta	Dieta	108–123	6,3–6,3	1,1	Não
GCK-23	p.Ala188Thr ^g	22/28	Normal	3/NR/ND	Dieta	Dieta	129–130	6,1–ND	1,5	Não
GCK-24	p.Asp409Valfs*22 ^g	8/10	Sobrepeso	2/1/1	Dieta	Dieta	114–130	6,2–7,1	1,4	ND
GCK-25	p.Val253Phe ^h	8/11	Baixo	2/5/1	Inibidor de DPP-4	ND	106–152	6,1–6,4	0,8	Não
GCK-26	c.[1135_1154del; 1134_1135ins9] ^g	1/10	Normal	3/3/2	Sulfonilureia	ND	102–144	5,9–6,8	1,7	Não
GCK-27	p.Cys371Serfs*33 ^g	10/11	Sobrepeso	2/1/0	Metformina	Dieta	122–ND	6,0–ND	1,9	Não
GCK-28	p.Arg250His ⁱ	7/13	Normal	3/4/2	Dieta	ND	110–118	5,9–6,1	2,1	Não

Probando	Variante	Idade ao diagnóstico clínico ^a /idade ao diagnóstico genético (anos)	Peso referido ao diagnóstico ^b	História familiar de diabetes/HLJ (G/R/HT) ^c	Tratamento ao diagnóstico	Tratamento atual	Intervalo GJ ^d (mg/dL) seguimento	Intervalo HbA1c ^e (%) seguimento	Peptídeo-C ^f (ng/mL) seguimento	Complicações microvasculares
GCK-29	p.Thr255Ile ^h	7/7	Normal	3/NR/ND	Dieta	Dieta	109–122	6,4–6,8	0,9	Não
GCK-30	p.Met224Thr ⁱ	14/36	Normal	1/NR/ND	Metformina	Metformina*	112–149	6,4–7,1	3,6	Não
HNF1A-1	p.Ser594Ile ^h	30/48	Sobrepeso	2/6/2	Insulina	ADOs	287–349	10,3–11,7	1,4	Retinopatia; Neuropatia; Microalbuminúria
HNF1A-2	p.Pro379Thr ^g	21/47	Normal	2/NR/ND	Sulfonilureia	ND	70–200	6,8–9,2	0,4	Não
HNF1A-3	p.Gly292Argfs*25 ^g	12/36	Baixo	2/NR/ND	Sulfonilureia	ADOs	80–157	5,8–9,2	1,5	Não
HNF1A-4	stopcodon perdido ^g	21/34	Normal	2/2/1	Metformina	ADOs	156–182	7,4–7,7	2,1	Não
HNF1A-5	p.Gly292Argfs*25 ^g	18/28	Normal	1/1/0	Insulina	Sulfonilureia	96–150	5,6–6,2	1,8	ND
HNF1A-6	p.Gly292Argfs*25 ^g	27/30	Normal	2/1/0	Sulfonilureia	Sulfonilureia	96–107	5,8–6,0	1,4	Não
HNF1A-7	p.Pro112Leu ^g	12/14	Normal	1/NR/ND	Sulfonilureia	ND	93–150	6,2–7,3	1,3	ND
HNF1A-8	p.Arg171Ter ^g	16/23	Baixo	2/NR/ND	Metformina	Sulfonilureia	105–141	6,5–7,1	3,0	Não
HNF1A-9	p.Gln520Ter ^g	14/20	Normal	3/7/3	Sulfonilureia	Sulfonilureia	88–101	5,2–6,3	2,2	Não
HNF1A-10	p.Gly292Argfs*25 ^g	27/30	Normal	3/NR/ND	Insulina	Sulfonilureia	78–167	5,9–6,3	3,2	Não

^a Diabetes ou HJL: hiperglicemia leve de jejum; ^b Referido pelo paciente (“peso referido”); ^c História familiar - G: gerações, R: pacientes rastreados, HT: pacientes heterozigotos para a variante da família; ^d GJ: Glicemia de jejum; ^e HbA1c: Hemoglobina glicada; ^f Peptídeo-C de jejum: três anos após o diagnóstico; Classificação da ACMG: ^g P (Patogênica), ^h P.P (Provavelmente patogênica), ⁱ S.I (Significado incerto); NR: não realizado; ND: não disponível; ADOs: 2 ou mais antidiabéticos orais (além da sulfonilureia)

*Metformina foi prescrita ou mantida em alguns pacientes MODY-GCK que possuíam sobrepeso ou ganharam peso durante o seguimento

**Casos isolados com maternidade/paternidade comprovadas por análise de haplótipos.

Valores de referência: GJ (70 mg/dL - 99 mg/dL); HbA1c (4,1 % - 6,0 %) e Peptídeo-C de jejum (1,1 ng/mL – 4,4 ng/mL)

Tabela 9 - Variantes alélicas candidatas identificadas durante a análise genética dos probandos com diagnóstico clínico de MODY

Mudança de nucleotídeo ¹	Mudança de aminoácido ¹	Região	Probando(s)	Consequência	Referência	ACMG ²	LOVD ID
GCK							
c.110T>C	p.Met37Thr	Éxon 2	GCK-14	Missense	Este estudo	S.I	GCK_00100
c.214G>A	p.Gly72Arg	Éxon 3	GCK-17	Missense	(62)	P	GCK_00083
c.326delC	p.Ile110Serfs*6	Éxon 3	GCK-8	Deleção-frameshift	Este estudo	P	GCK_00106
c.413A>C	p.Gln138Pro	Éxon 4	GCK-9	Missense	(100)	P.P	GCK_00107
c.418A>G	p.Lys140Glu	Éxon 4	GCK-19	Missense	Este estudo	P.P	GCK_00122
g.47217T>C / c.483+2T>C	-	Íntron 4	GCK-1	Mudança de sítio de <i>Splice</i>	(43)	P	GCK_00108
c.505A>G	p.Lys169Glu	Éxon 5	GCK-15	Missense	Este estudo	S.I	GCK_00109
c.562G>A	p.Ala188Thr	Éxon 5	GCK-23	Missense	(101)	P	GCK_00110
c.571C>T	p.Arg191Trp	Éxon 5	GCK-3, GCK-6	Missense	(102)	P	GCK_00061
g.48309C>A / c.580-3C>A	-	Íntron 5	GCK-4	Mudança de sítio de <i>Splice</i>	Este estudo	S.I	GCK_00112
c.617C>T	p.Thr206Met	Éxon 6	GCK-18	Missense	(103)	P	GCK_00123
c.661G>A	p.Glu221Lys	Éxon 6	GCK-12	Missense	(104)	P.P	GCK_00124
c.671T>C	p.Met224Thr	Éxon 6	GCK-30	Missense	(100)	S.I	GCK_00125
c.749G>A	p.Arg250His	Éxon 7	GCK-28	Missense	Este estudo	S.I	GCK_00126
c.757G>T	p.Val253Phe	Éxon 7	GCK-25	Missense	(45)	P.P	GCK_00113
c.764C>T	p.Thr255Ile	Éxon 7	GCK-16, GCK-29	Missense	(105)	P.P	GCK_00114
c.767A>C	p.Glu256Ala	Éxon 7	GCK-13	Missense	Este estudo	P.P	GCK_00115
c.791G>A	p.Gly264Asp	Éxon 7	GCK-11	Missense	Este estudo	P.P	GCK_00101
c.1106_1111dup	p.Cys371Serfs*33	Éxon 9	GCK-27	Duplicação-frameshift	Este estudo	P	GCK_00116
c.[1135_1154del; 1134_1135ins9]	-	Éxon 9	GCK-5, GCK-22, GCK-26	Deleção/inserção	Este estudo	P	GCK_00127
c.1151C>T	p.Ala384Val	Éxon 9	GCK-20	Missense	(45)	P.P	GCK_00117
c.1226delA	p.Asp409Valfs*22	Éxon 9	GCK-24	Deleção-frameshift	Este estudo	P	GCK_00118
c.1247delA	p.His416Profs*15	Éxon 9	GCK-7	Deleção-frameshift	Este estudo	P	GCK_00119
c.1268T>A	p.Phe423Tyr	Éxon 10	GCK-2, GCK-10	Missense	(43)	P.P	GCK_00120
c.1340G>A	p.Arg447Gln	Éxon 10	GCK-21	Missense	(106)	P.P	GCK_00121
HNF1A							
c.335C>T	p.Pro112Leu	Éxon 2	HNF1A-7	Missense	(107)	P	HNF1A_00103
c.511C>T	p.Arg171Ter	Éxon 2	HNF1A-8	Nonsense	(108)	P	HNF1A_00125
c.872dupC	p.Gly292Argfs*25	Éxon 4	HNF1A-3, HNF1A-5, HNF1A-6, HNF1A-10	Duplicação-frameshift	(16)	P	HNF1A_00161
c.1135C>A	p.Pro379Thr	Éxon 6	HNF1A-2	Missense	(109)	P	HNF1A_00181
c.1558C>T	p.Gln520Ter	Éxon 8	HNF1A-9	Nonsense	Este estudo	P	HNF1A_00340
c.1722_1740dup	stopcodon perdido	Éxon 9	HNF1A-4	Duplicação-inframe	Este estudo	P	HNF1A_00369
c.1781G>T	p.Ser594Ile	Éxon 10	HNF1A-1	Missense	(110)	P.P	HNF1A_00370

¹ Transcrito referência (RefSeq): NM_000162.3 (GCK) / NM_000545.6 (HNF1A); ² Classificação da ACMG: P (Patogênico), P.P (Provavelmente patogênico), S.I (Significado incerto)

5.3 Probandos Positivos e Negativos

Os dados clínico-laboratoriais foram estatisticamente comparados entre os probandos com resultado genético positivo e negativo dos grupos MODY-*GCK* e MODY-*HNF1A* (tabela 10).

Entre os probandos do grupo MODY-*GCK*, aqueles com etiologia genética confirmada apresentaram uma menor idade ao diagnóstico ($p = 0,0002$) e valores maiores de HbA1c ($p = 0,039$).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os probandos do grupo MODY-*HNF1A*.

Tabela 10 - Comparação entre as características clínico-laboratoriais dos probandos com diagnóstico genético positivo e negativo

	GCK		p	HNF1A		p
	Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
Número de casos	30	19		10	50	
Sexo feminino (%)	40	63	0,1141 ^f	80	56	0,1573 ^f
Não obesos ^a (%)	100	100	0,1161 ^f	100	96	0,5201 ^f
História familiar positiva de diabetes / hiperglicemia leve de jejum (%)	97	84	0,1208 ^f	100	86	0,2081 ^f
Idade ao diagnóstico (anos) ^e	7,5 (1–32)	18 (5–36)	0,0002^g	19,5 (12–30)	20 (3–42)	0,5011 ^h
^b GJ ao diagnóstico (mg/dL) ^e	121 (110–142)	114 (90–139)	0,0546 ^h	228 (120–380)	193 (99–525)	0,7128 ^g
HbA1c ao diagnóstico (%) ^e	6,5 (5,9–7,2)	5,9 (5,2–7,6)	0,0398^h	9,0 (6,6–12,0)	9,0 (5,7–13,0)	0,7856 ^h
^c Incremento no TOTG (mg/dL) ^e	36 (0–104)	56 (0–258)	0,7497 ^g	113 (109–116)	109 (0–147)	0,5646 ^h
^d Peptídeo-C (ng/mL) ^e	1,5 (0,6–3,6)	1,6 (1,2–3,3)	0,4454 ^g	2,0 (0,4–3,2)	2,0 (0,7–3,8)	0,9585 ^g

^a Referido pelo paciente (“peso referido”); ^b GJ: glicemia de jejum; ^c TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose; ^d Peptídeo-C de Jejum: três anos após o diagnóstico; ^e [mediana (intervalo)]; ^f *Pearson's Chi-squared test*; ^g *Wilcoxon signed-rank test*; ^h *Student's' t Test*
Valores de referência: GJ (70 mg/dL - 99 mg/dL); HbA1c (4,1% - 6,0 %) e Peptídeo-C de jejum (1,1 ng/mL - 4,4 ng/mL)

5.4 Análise de Patogenicidade

Após a implementação dos critérios de classificação da ACMG/AMP, 36% (9/25) das variantes no gene *GCK* foram classificadas como patogênicas; 44% (11/25), como provavelmente patogênicas e 20% (5/25), com uma associação incerta com o fenótipo de MODY (figura 10 e tabela 11).

Levando em consideração apenas as variantes no gene *GCK* ainda não descritas na literatura, 42% (5/12) foram classificadas como patogênicas; 25% (3/12), como provavelmente patogênicas e 33% (4/12), como tendo um significado ainda incerto.

Figura 10 - Classificação final, segundo os critérios da ACMG/AMP, das variantes alélicas candidatas no gene *GCK*

Entre as variantes candidatas no gene *HNF1A*, 86% (6/7) puderam ser consideradas patogênicas e 14% (1/7), provavelmente patogênicas (figura 11 e tabela 11). Ambas as variantes não descritas na literatura foram classificadas como patogênicas.

Figura 11 - Classificação final, segundo critérios da ACMG/AMP, das variantes alélicas candidatas no gene *HNF1A*

Com exceção daquelas variantes extremamente frequentes (tabelas 6 e 7), nenhuma alteração candidata à associação com o fenótipo foi classificada como benigna ou provavelmente benigna.

Todas as variantes únicas aqui descritas, independentemente da classificação obtida, bem como seus respectivos probandos, foram registrados em um *Locus Specific Mutation Database* hospedado pela plataforma LOVD (113), denominado *Monogenic Diabetes*. Tal banco de dados é curado por pesquisadores de um dos maiores grupos do mundo que investiga o fenótipo de *MODY* (*Department of Molecular Genetics, Royal Devon & Exeter NHS Foundation Trust, Exeter, UK*).

Tabela 11 - Classificação ACMG / AMP das variantes candidatas nos genes *GCK* e *HNF1A*

Troca de nucleotídeo ¹	Troca de aminoácido ¹	Dados populacionais	Dados <i>In silico</i> ²	ACMG						Evidência final	Classificação ³
				Dados de cossegregação		Dados funcionais		Dados adicionais			
				Referência	Categoria	Referência	Categoria				
GCK											
c.110T>C	p.Met37Thr	PM2	PP3	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PM1	S.I	
c.214G>A	p.Gly72Arg	PM2	PP3	(45, 62, 66, 112-117)	PP1**	(114, 118-120)	PS3	PM6	PM2 PP3 PP1** PS3 PM6	P	
c.326delC	p.Ile110Serfs*6	PM2	PVS1	Este estudo	SE	ND	PM1	PS2	PM2 PVS1 PM1 PS2	P	
c.413A>C	p.Gln138Pro	PM2	PP3	(100, 121)	PP1*	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PP1* PM1	P.P	
c.418A>G	p.Lys140Glu	PM2	PP3	Este estudo	PP1	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PP1 PM1	P.P	
g.47217T>C / c.483+2T>C	-	PM2	PVS1	(43)	SE	ND	SE	PS2	PM2 PVS1 PS2	P	
c.505A>G	p.Lys169Glu	PM2	PP3	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PM1	S.I	
c.562G>A	p.Ala188Thr	PM2	PP3	(101, 103, 106, 113, 116, 122, 123)	PP1**	(124)	PS3	SE	PM2 PP3 PP1** PS3	P	
c.571C>T	p.Arg191Trp	PM2	PM5	(45, 100, 102, 106, 125-131)	PP1**	ND	PM1	SE	PM2 PM5 PP1** PM1	P	
g.48309C>A / c.580-3C>A	-	PM2	PP3	Este estudo	SE	ND	SE	SE	PM2 PP3	S.I	
c.617C>T	p.Thr206Met	PM2	PP3	(66, 100, 103, 113, 129, 131-136)	PP1**	(134, 135)	PS3	PS2	PM2 PP3 PP1** PS3 PS2	P	
c.661G>A	p.Glu221Lys	PM2	PP3	(80, 100, 104, 113)	PP1**	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PP1** PM1	P.P	
c.671T>C	p.Met224Thr	PM2	PP3	(100)	SE	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PM1	S.I	
c.749G>A	p.Arg250His	PM2	PP3	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PM1	S.I	
c.757G>T	p.Val253Phe	PM2	PP3	(45)	PP1**	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PP1** PM1	P.P	
c.764C>T	p.Thr255Ile	PM2	PP3	(105)	PP1*	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PP1* PM1	P.P	
c.767A>C	p.Glu256Ala	PM2	PM5	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PM5 PM1	P.P	
c.791G>A	p.Gly264Asp	PM2	PM5	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PM5 PM1	P.P	
c.1106_1111dup	p.Cys371Serfs*33	PM2	PVS1	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PVS1 PM1	P	
c.[1135_1154del; 1134_1135ins9]	-	PM2	PVS1	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PVS1 PM1	P	
c.1151C>T	p.Ala384Val	PM2	PM5	(45)	PP1*	ND	PM1	SE	PM2 PM5 PP1* PM1	P.P	
c.1226delA	p.Asp409Valfs*22	PM2	PVS1	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PVS1 PM1	P	
c.1247delA	p.His416Profs*15	PM2	PVS1	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PVS1 PM1	P	
c.1268T>A	p.Phe423Tyr	PM2	PP3	(137)	PP1*	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PP1* PM1	P.P	
c.1340G>A	p.Arg447Gln	PM2	PP3	(106, 116, 125, 138)	PP1**	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PP1** PM1	P.P	

Troca de nucleotídeo ¹	Troca de aminoácido ¹	Dados populacionais	Dados <i>In silico</i> ²	ACMG		Dados funcionais	Dados adicionais	Evidência final	Classificação ³
				Dados de cossegregação	Dados funcionais				
				Referência	Categoria	Referência	Categoria		
<i>HNFI1A</i>									
c.335C>T	p.Pro112Leu	PM2	PP3	(107, 109, 139, 140)	PP1**	(139, 140)	PS3	SE	PM2 PP3 PP1** PS3 P
c.511C>T	p.Arg171Ter	PM2	PVS1	(66, 68, 109, 108, 139, 140-143)	PP1**	(139, 140, 144, 145)	PS3	SE	PM2 PVS1 PP1** PS3 P
c.872dupC	p.Gly292Argfs*25	PM2	PVS1	(16, 35, 36, 59, 62, 64, 66, 67, 69, 108-110, 122, 128, 132, 133, 140, 142, 143, 146-157)	PP1**	(144, 145, 158)	PS3	SE	PM2 PVS1 PP1** PS3 P
c.1135C>A	p.Pro379Thr	PM2	PM5	(60)	PP1	ND	PM1	SE	PM2 PM5 PP1 PM1 P
c.1558C>T	p.Gln520Ter	PM2	PVS1	Este estudo	PP1**	ND	PM1	SE	PM2 PVS1 PP1** PM1 P
c.1722_1740dup	<i>stopcodon</i> perdido	PM2	PVS1	Este estudo	SE	ND	PM1	SE	PM2 PVS1 PM1 P
c.1781G>T	p.Ser594Ile	PM2	PP3	(109, 110)	PP1**	ND	PM1	SE	PM2 PP3 PP1** PM1 P.P

¹ Transcrito referência (RefSeq): NM_000162.3 (*GCK*) / NM_000545.6 (*HNFI1A*); ² *MutationTaster*, *PolyPhen-2*, *SIFT*, *PROVEAN* e *Mutation Assessor*; ³ Categorias e classificação da ACMG: PVS1 (variante que comprometa completamente a função proteica - *null* - em um gene cuja perda de função - LOF é um mecanismo de doença conhecido - *nonsense* / *frameshift* / sítios de *splicing* ± 1 ou 2 / códon inicial / deleções de éxons); PS2 (variante *de novo* com paternidade e maternidade confirmadas); PS3 (Estudos funcionais *in vitro* / *in vivo* que demonstrem um efeito deletério da variante no gene ou em seu produto); PM1 (variante localizada em um *hot spot* e/ou um domínio proteico importante em que não foram mapeadas variantes frequentes); PM2 (variante ausente em controles ou em uma frequência extremamente baixa em bancos de dados genômicos como *Exome Sequencing Project*, *1.000 Genomes Project* ou *Exome Aggregation Consortium*); PM5 (nova variante *missense* em uma posição - resíduo - em que outra variante *missense* já foi descrita como patogênica); PM6 (variante *de novo* sem paternidade e maternidade confirmadas); PP1 (cossegregação com a doença em inúmeros membros afetados de uma família em um gene definitivamente conhecido com causador do fenótipo); PP1* (PP1 como evidência moderada devido ao aumento dos dados de cossegregação); PP1** (PP1 como evidência forte devido ao aumento dos dados de cossegregação); PP3 (análise *in silico* da variante em preditores indica um comprometimento do gene ou de seu produto); P (Patogênico), P.P (Provavelmente patogênico), S.I (Significado incerto)

ND: não disponível; SE: sem evidência.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização Clínico-Laboratorial

Pacientes com suspeita clínica de MODY apresentam, ainda jovens, hiperglicemia moderada e assintomática com uma importante história familiar de diabetes e ausência de obesidade (5).

Em nossa coorte dos geneticamente identificados com MODY-*GCK*, todos os parâmetros metabólicos (glicemia de jejum, HbA1c e incremento pós-TOTG) estavam dentro dos intervalos esperados e registrados na literatura (5,40,46). A idade de diagnóstico, entretanto, mostrou grande variabilidade, com indivíduos sendo reconhecidos na segunda e terceira décadas de vida. Tal evento é frequentemente observado neste subtipo de MODY, uma vez que a hiperglicemia é leve e assintomática (36).

No grupo de pacientes com MODY-*HNF1A* um perfil metabólico com valores elevados de glicemia de jejum e HbA1c, em comparação àqueles com MODY-*GCK*, foi confirmado como na literatura, além de uma idade de diagnóstico mais tardia (adulto jovem) (46).

Em ambos os grupos havia indivíduos que, ao diagnóstico, apresentavam sobrepeso (tabela 8), demonstrando que essa característica não deve ser utilizada como critério rígido de exclusão, uma vez que, a depender da população estudada, sobrepeso e obesidade podem ser um achado frequente em indivíduos com MODY (13,153,160).

O longo intervalo existente entre a idade do diagnóstico clínico e sua confirmação genética (tabela 8) expressa como uma investigação genético-molecular ainda é um procedimento demorado no Brasil, sobretudo pelo alto custo e baixa disponibilidade, restrita a poucos centros especializados.

Com exceção da idade ao diagnóstico e dos valores de HbA1c, o grupo com diagnóstico genético positivo de MODY-*GCK* não diferiu daquele com diagnóstico negativo nas demais características clínico-laboratoriais

comparadas. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos positivo e negativo para MODY-*HNF1A* (tabela 10).

Estes resultados nos permitem concluir que uma seleção gene-candidato, baseada nas características clínicas não é algo tão preciso, mesmo no subtipo clinicamente mais marcante aqui investigado, como é o caso do MODY-*GCK*. Além disso, o expressivo percentual de casos negativos com fenótipo característico de MODY (ausência de grandes diferenças estatísticas, quando comparado ao grupo positivo) indica a provável existência de subtipos mais raros.

Os dados de seguimento clínico demonstraram uma melhora significativa nos parâmetros metabólicos. Em pacientes com MODY-*GCK* tal feito pode simplesmente ser creditado à realização de uma dieta mais equilibrada quanto ao consumo de carboidratos (40), já em MODY-*HNF1A*, a utilização de hipoglicemiantes orais da família das sulfonilureias possui um efeito terapêutico mais expressivo (54).

6.2 Caracterização Genético-Molecular

A coorte investigada neste estudo apresentou uma alta prevalência de MODY-*GCK* (28% - 30/109) em relação a MODY-*HNF1A* (9% - 10/109), com 63% dos casos sem etiologia genética esclarecida (69/109).

Estes números são similares àqueles recentemente publicados em um registro nacional de casos brasileiros de MODY (161), no qual foram compilados dados clínico-laboratoriais mais detalhados dos casos nacionais publicados nos últimos anos. Nossos resultados poderão, no futuro, integrar esses registros.

Nossa coorte apresentou uma elevada positividade durante a investigação de MODY-*GCK* (61%), quando comparada a MODY-*HNF1A* (17%). Tais dados podem ser explicados pela apresentação clínica mais típica dos casos com suspeita de MODY-*GCK*, permitindo, assim, um melhor diagnóstico

diferencial entre outros tipos de diabetes. Entretanto, um grande número de pacientes com etiologia genética não esclarecida foi observado (63%), muito maior do que a prevalência estimada mundial de 15%-25% (5).

Os casos clinicamente suspeitos com resultado genético negativo aqui observados devem ser submetidos a uma abordagem de sequenciamento mais ampla, com a utilização de painéis genômicos customizados, de modo a esclarecer a provável existência de subtipos mais raros da doença. A redução do custo de aplicação dos novos métodos de sequenciamento em larga escala tem facilitado a investigação de múltiplos *loci* em pacientes com suspeita clínica de MODY, contribuindo para a elucidação de um percentual destes casos sem diagnóstico (74).

Em nossa casuística, 56% (18/32) das variantes identificadas já haviam sido descritas na literatura em outra(s) família(s). A maioria, 94% (17/18), recebeu uma classificação da ACMG/AMP, de acordo com as discussões prévias a respeito de sua patogenicidade. Além disso, a aplicação do *guideline* nos permitiu distinguir, de maneira mais detalhada, uma variante patogênica de uma provavelmente patogênica.

A única variante que apresentou uma classificação conflitante foi a troca *missense* c.671T>C / p.Met224Thr, aqui classificada como possuindo um significado incerto, devido principalmente à ausência de dados de cossegregação nos registros literários prévios.

Esta análise individual e cuidadosa de cada uma das evidências de patogenicidade envolvidas nos permitiu realizar uma avaliação mais plausível de por que uma variante está relacionada de maneira causal a um fenótipo, quando comparada às argumentações arbitrárias comumente realizadas. Este é um elemento muito importante não apenas no ambiente acadêmico, como também e sobretudo em uma rotina de diagnóstico laboratorial (162).

Em nossa coorte, 44% (14/32) das variantes identificadas não estão descritas em nenhuma outra família presente na literatura. Uma elevada taxa de variantes novas é frequentemente observada em MODY, atingindo percentuais que variam de 60%-65% entre os três principais subtipos (*GCK*, *HNF1A* e *HNF4A*) (42).

Esta característica privada das variantes, somada à ausência de *hotspots* clássicos, com exceção do presente no gene *HNF1A* (65,147), destaca a frequente dificuldade em MODY de correlacionar genótipo e fenótipo de maneira causal.

Após a aplicação dos critérios da ACMG/AMP, 71% (10/14) das variantes não descritas foram classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, fortalecendo a suspeita de sua associação com o fenótipo. As variantes restantes (4/14 - 29%) foram classificadas como tendo um significado incerto. Alterações pertencentes a esta categoria não devem guiar a conduta clínica do paciente, e sua relação com o fenótipo precisa ser cuidadosamente investigada.

A ausência de recorrência das variantes em outros estudos, o número reduzido de meioses informativas identificadas e os dados clínico laboratoriais e de rastreamento escassos foram os fatores que mais contribuíram para a evidência incerta de patogenicidade atribuída.

Entre as variantes presentes no gene *GCK*, cinco delas merecem ser destacadas por serem particularmente interessantes. A variante de significado incerto (ACMG/AMP) **g.48309C>A / c.580-3C>A**, localizada na região do sítio acceptor de *splicing* do éxon 6, foi identificada em um trio composto por pai e filha (probando) com hiperglicemia leve de jejum (anexo E). Um número significativo de variantes similares já foram associadas ao quadro de MODY-*GCK*, incluindo algumas na posição intrônica +5 do éxon adjacente (36).

Embora muitos *softwares* de grande sensibilidade e especificidade tenham sido desenvolvidos com o intuito de prever o impacto de alterações que comprometam o processamento do RNAm não maduro, a interpretação de sua real consequência biológica ainda necessita de algumas etapas adicionais. Uma análise da sequência do RNAm e, ou, quando possível, do produto proteico deve complementar as evidências *in silico* e o estudo de cossegregação (82). Infelizmente, até o momento, apenas os dois últimos foram realizados em nossa investigação.

De maneira geral, a *UK Clinical Molecular Genetics Society / Dutch Society of Clinical Genetic Laboratory Specialists* (83) recomenda a análise *in*

silico de alterações em sítios de *splicing* com, ao menos, três diferentes *softwares*. Neste quesito a variante aqui destacada resultou em uma significativa redução da eficiência do sítio canônico acceptor de *splicing*, quando comparado com sua sequência selvagem nos quatro preditores utilizados (GeneSplicer; Human Splicing Finder, MaxEntScan e NNSplice) (95,96,163,164).

O mesmo *guideline* indica, entretanto, que é inaceitável basear uma associação causal levando em consideração apenas evidências preditivas. Com isso em mente, demos início ao estudo de cossegregação da família que, até o momento, apresentou genotipagens concordantes. Deve-se salientar, entretanto, que mesmo tal análise possui suas ressalvas, já que existe a probabilidade de $\frac{1}{2}$ de que o pai afetado seja heterozigoto ao acaso (100). Desta maneira a expansão do número de familiares genotipados é uma boa forma de aproximar, cada vez mais, uma variante de seu possível fenótipo associado.

A segunda, terceira e quarta alterações no gene *GCK* - patogênicas (ACMG/AMP) - uma deleção *frameshift* **c.326delC / p.Ile110Serfs*6**, uma modificação em sítio canônico de *splicing* **g.47217T>C/c.483+2T>C** (IVS4) e, por fim, uma variante do tipo *missense* **c.617C>T / p.Thr206Met**, chamaram-nos a atenção por sua ocorrência *de novo*.

Alterações desse tipo eram descritas, até então, como raramente presentes em casos MODY-*GCK* (42,48). Isso pode ser explicado, principalmente, pelo viés de investigação ancorado no padrão de herança autossômico dominante da doença, ou seja, apenas probandos com um dos pais sintomáticos eram fortes candidatos a estudo genético.

Nas três variantes destacadas, a análise genética da família demonstrou que os pais normoglicêmicos não eram portadores da variante. A maternidade e a paternidade foram comprovadas por análise de haplótipos.

Stanik *et al.*, 2014 (48), investigaram a prevalência de três subtipos de MODY em uma coorte com 150 indivíduos que preenchiam parcialmente o critério história familiar. Variantes possivelmente associadas ao fenótipo foram identificadas em 38% dos probandos (58/150), sendo que em 33% (19/58) destes o alelo foi herdado do parental assintomático. Um expressivo número de variantes *de novo* também foi observado (19% - 11/58).

Além de serem subestimadas quanto a sua real prevalência, devido ao critério de seleção (agregação familiar), variantes *de novo* devem sempre ser interpretadas com cautela. Mesmo que sua presença indique um forte vínculo de associação com o fenótipo em alguns modelos de herança, como o autossômico dominante, essa conclusão deve ser ponderada por fatores como paternidade comprovada dos pais e presença esperada de variantes *de novo* no genoma que podem, matematicamente, cossegregar ao fenótipo (82).

A quinta e última variante no gene *GCK* que nos intrigou foi o patogênico (AMG/AMP) rearranjo complexo **c.[1135_1154delGCGCACATGTGCTCGGCGGG; 1134_1135insCTCATCAAC]**, identificado em três probandos, aparentemente, não relacionados.

Grandes deleções/inserções do tipo não foram relatadas com frequência em famílias com MODY-*GCK* (36). O fato de os três probandos serem provenientes de uma mesma região do Estado de Santa Catarina nos fez questionar a existência de um possível efeito fundador, algo raramente descrito com variantes neste gene (64,129,165).

A história familiar dos três indivíduos deve ser investigada com o intuito de identificar a existência do ancestral em comum mais próximo. Além disso, análise de vínculo genético (estudo de haplótipos) poderia ser empregada para confirmar/descartar tal hipótese.

Das sete variantes identificadas no gene *HNF1A*, apenas 28% (2/7) não foram ainda descritas na literatura, sendo uma delas a *nonsense* patogênica (ACMG/AMP) **c.1558C>T / p.Gln520Ter**. A troca está presente em uma família com 7 indivíduos genotipados, dos quais 4 possuem a alteração (2 com diabetes e 2 com pré-diabetes). Metade deles manifestou o fenótipo durante a primeira década de vida: probando aos 14 anos e mãe aos 19 anos. O tio materno e a avó materna, por sua vez, foram diagnosticados com pré-diabetes aos 43 e 74 anos, respectivamente.

O fenômeno observado nesta família pode ser explicado como uma penetrância incompleta idade-dependente (55). Variantes em genes com múltiplos transcritos, como o *HNF1A* (62), podem não afetar todas as isoformas

existentes. A isoforma *HNF1A* (B), por exemplo, é a mais prevalente no pâncreas adulto (166) e possui 7 éxons, em comparação aos 10 presentes na isoforma A, e aos apenas 6 da isoforma C (69) (figura 11) (69).

Figura 12 - Transcritos alternativos do gene *HNF1A* e seus domínios proteicos

A variante *nonsense* **c.1558C>T / p.Gln520Ter** está localizada no éxon 8 do transcrito referência *HNF1A* (A), uma posição ausente nas demais isoformas, incluindo o transcrito pancreático mais prevalente *HNF1A* (B), talvez explicando a variabilidade fenotípica observada em nossa família.

Interessantemente apenas uma outra variante *nonsense* no mesmo éxon (c.1509C>A / p.Tyr503Ter) já foi descrita na literatura em três famílias não relacionadas (111), entretanto dados clínico-laboratoriais não estão disponíveis para que comparações sejam realizadas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitiram concluir que:

- A construção e implementação de um sistema de encaminhamento de pacientes, baseado em computação na nuvem, mostrou ser viável e efetivo. Além disso, desempenhou importante papel durante o estabelecimento deste novo centro de triagem e diagnóstico genético-molecular de MODY em território nacional.
- As prevalências observadas de MODY-*GCK*, MODY-*HNF1A* e de casos geneticamente negativos (não-*GCK*/não-*HNF1A*) foram similares às aquelas descritas recentemente em coortes brasileiras.
- Os resultados aqui obtidos expandiram não apenas o número de variantes como também o de indivíduos associados ao fenótipo investigado.
- A aplicação clínica dos critérios da ACMG/AMP demonstrou ser crucial durante a caracterização dos achados genéticos de uma rotina diagnóstica, aprimorando e melhor justificando a provável associação genótipo-fenótipo proposta.

Anexo A - Questionário MODY - Dados Clínico-laboratoriais - Casos Índices**Questionário MODY - 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)

CHECKLIST - Dados necessários para o preenchimento do formulário eletrônico de MODY:

<https://goo.gl/kaysQh>***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. CRM do médico solicitante *

7. Telefone de contato do médico solicitante

(DDD) + número do telefone

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 *

Tipo de MODY

Marcar apenas uma oval.

- ☐ MODY (subtipo não definido)
- ☐ MODY 1
- ☐ MODY 2
- ☐ MODY 3
- ☐ Outro: _____

11. Cidade e Estado de nascimento *

12. Data do nascimento *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

13. Idade atual *

(anos)

14. Idade ao diagnóstico de diabetes ou pré-diabetes *

(anos)

15. Associações clínicas *

Marque todas que se aplicam.

- ☐ Hipertensão arterial sistêmica
- ☐ Dislipidemia
- ☐ Obesidade central
- ☐ Acantose nigricans
- ☐ Hipoacusia / Surdez
- ☐ Nenhuma das anteriores
- ☐ Outro: _____

Peso

16. Peso ao nascimento

(g)

17. Possui dados de peso da época do diagnóstico de diabetes ou pré-diabetes? **Marcar apenas uma oval.*☐

Sim

Ir para a pergunta 18.☐

Não

*Ir para a pergunta 21.***Dados antropométricos AO DIAGNÓSTICO****18. Peso ao diagnóstico (Kg) ***

19. Altura ao diagnóstico (m) *

20. IMC ao diagnóstico (Kg/m²)

*Ir para a pergunta 22.***Peso referido AO DIAGNÓSTICO****21. Peso ao diagnóstico ***

(referido pelo paciente na época do diagnóstico)

Marcar apenas uma oval.☐

Baixo peso

☐

Peso normal

☐

Sobrepeso

☐

Obesidade

Dados antropométricos ATUAIS**22. Peso atual (Kg) ***

23. Altura atual (m) *

24. IMC atual *(kg/m²)

Sintomas ao diagnóstico

25. Sintomas relacionados a hiperglicemia ao diagnóstico **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sintomático *Ir para a pergunta 26.*
- ☐ Assintomático *Ir para a pergunta 27.*

Sintomático**26. Quadro clínico ****Marque todas que se aplicam.*

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

*Ir para a pergunta 28.***Assintomático****27. 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 28.***Tratamento do diabetes****28. 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

29. 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

30. Duração do tratamento previamente descrito *

Informar número de dias ou meses ou anos

31. Tratamento atual do diabetes *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Apenas insulina *Ir para a pergunta 32.*
- ☐ Insulina + anti-diabético oral *Ir para a pergunta 35.*
- ☐ Apenas sulfoniluréia *Ir para a pergunta 39.*
- ☐ Apenas metformina *Ir para a pergunta 43.*
- ☐ Apenas inibidor de DPP4 *Ir para a pergunta 43.*
- ☐ Associações de anti-diabéticos orais *Ir para a pergunta 42.*
- ☐ Apenas dieta *Ir para a pergunta 43.*

Tratamento atual do DM

Insulina

32. Tipo de insulina *

Marque todas que se aplicam.

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

33. Dose TOTAL de insulina utilizada (unidades / kg / dia) *

(dose de insulina basal + insulina bolus)

34. Tempo de uso de insulina *

(informar se em meses ou anos)

Ir para a pergunta 43.

Tratamento atual do DM

Associação insulina + anti-diabético oral (ADO)

Insulina

35. 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)

36. Dose TOTAL de insulina (unidades / kg / dia) utilizada (associada a ADO) **(dose de insulina basal + insulina bolus)*

37. Tempo de uso de insulina (associada a ADO)

*

(informar se em meses ou anos)

Anti-diabéticos orais

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

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

Ir para a pergunta 43.

Tratamento atual do DM

Sulfoniluréia

39. Tipo de sulfoniluréia **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Glibenclamida
- ☐ Gliclazida
- ☐ Glimepirida
- ☐ Glipizida

40. Dose total diária de sulfoniluréia **(mg/dia)*

41. Tempo de uso de sulfoniluréia **(informar se em meses ou anos)*

Ir para a pergunta 43.

Tratamento atual do DM

Associações de anti-diabéticos orais (ADOs)

42. 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

43. História familiar de diabetes/pré-diabetes? *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim *Ir para a pergunta 44.*
- ☐ Não *Ir para a pergunta 61.*
- ☐ Desconhecido *Ir para a pergunta 61.*

Com antecedente familiar

44. Número de familiares com diabetes/pré-diabetes *

45. Pais com DM/pré-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.*

Ir para a pergunta 46.

Histórico familiar de DM/Pré-DM - Pais

46. Parentesco *

Marque todas que se aplicam.

- ☐ Pai
- ☐ Mãe

47. Idade atual (anos) *

[ou informar se falecido(a)]

48. Idade do diagnóstico do diabetes/pré-diabetes **Marcar apenas uma oval.*

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

49. Obesidade ou sobrepeso ao diagnóstico? **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
- ☐ Não

50. Tipo de diabetes referido **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Pré-DM (Glicemia de jejum alterada ou Intolerância à glicose)
- ☐ DM1
- ☐ DM2
- ☐ não sabe o tipo

51. Tratamento atual **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Insulina
- ☐ Sulfoniluréia
- ☐ Metformina
- ☐ Apenas dieta
- ☐ Outros

Histórico familiar de DM/Pré-DM**52. Avós com DM/Pré-DM? ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim *Ir para a pergunta 53.*
- ☐ Não *Ir para a pergunta 59.*
- ☐ Não soube informar *Ir para a pergunta 59.*

Histórico familiar de DM/Pré-DM - Avós**53. Parentesco ****Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Avô paterno
- ☐ Avó paterna
- ☐ Avô materno
- ☐ Avó materna

54. Idade atual (anos) *

[ou informar se falecido(a)]

55. Idade do diagnóstico do diabetes/pré-diabetes *

Marcar apenas uma oval.

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

56. Obesidade ou sobrepeso ao diagnóstico? *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não

57. Tipo de diabetes referido *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Pré-DM (Glicemia de jejum alterada ou Intolerância à glicose)
- ☐ DM1
- ☐ DM2
- ☐ não sabe o tipo

58. Tratamento atual *

Marque todas que se aplicam.

- ☐ Insulina
- ☐ Sulfoniluréia
- ☐ Metformina
- ☐ Apenas dieta
- ☐ Outros

Histórico familiar de DM/Pré-DM - Outros parentes**59. Grau de parentesco dos demais familiares com DM/Pré-DM**

(ex. 1 irmã e 2 tios paternos)

Exames AO DIAGNÓSTICO de diabetes

60. Possui exames DA ÉPOCA DO DIAGNÓSTICO de diabetes ou pré-diabetes? *

(glicemia de jejum, Hb glicada, etc)

Marcar apenas uma oval.☐ Sim☐ Não *Ir para a pergunta 69.**Ir para a pergunta 61.***Dados laboratoriais - AO DIAGNÓSTICO DE DM - Caso Índice****61. Data aproximada da coleta para a realização dos exames laboratoriais abaixo ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012***62. Glicemia de jejum ***

(mg/dL)

63. Insulinemia de jejum

(μU/mL)

64. Peptídeo C de jejum

(ng/mL)

65. Peptídeo C pós-prandial

(ng/mL)

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

HbA1c**67. Hemoglobina glicada (HbA1c) ***

(%)

68. Método (HbA1c)*Marcar apenas uma oval.*☐ Imunoturbidimetria☐ HPLC**Teste de tolerância oral à glicose**

69. Realizou teste de tolerância oral à glicose (curva glicêmica)? **Marcar apenas uma oval.*☐ Sim☐ Não *Ir para a pergunta 72.***Teste de tolerância oral à glicose****70. Glicemia basal (0 minutos)**

(mg/dL)

71. Glicemia aos 120 minutos

(mg/dL)

Anticorpo anti-GAD**72. Anticorpo anti-GAD ****Marcar apenas uma oval.*☐ Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 74.*☐ Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 77.*☐ Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 77.***73. Data da realização do exame (anti-GAD)***Exemplo: 15 de dezembro de 2012*

Anti-GAD positivo**74. Título (anti-GAD) ***

(U/L)

75. Método (anti-GAD)*Marcar apenas uma oval.*☐ Radioimunoensaio (RIA)☐ ELISA**76. Valor de referência utilizado (anti-GAD) ***

Anticorpo anti-tirosina fosfatase (IA2)

77. Anticorpo anti-IA2 **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 79.*
- ☐ Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 82.*
- ☐ Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 82.*

78. Data da realização do exame (anti-IA2)

*Exemplo: 15 de dezembro de 2012***Anti-IA2 positivo****79. Título (IA2) ***

(U/L)

80. Método (IA2)*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Radioimunoensaio (RIA)
- ☐ ELISA

81. Valor de referência utilizado (IA2) *

Anticorpo anti-insulina (IAA)**82. Anticorpo anti-IAA ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 84.*
- ☐ Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 87.*
- ☐ Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 87.*

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

*Exemplo: 15 de dezembro de 2012***Anti-IAA positivo****84. Título (IAA) ***

(U/L)

85. Método (IAA)*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Radioimunoensaio (RIA)
- ☐ ELISA

86. Valor de referência utilizado (IAA) *

Proteína C reativa (PCR)

87. Dosagem (PCR) *

Marcar apenas uma oval.

☐

Realizada

Ir para a pergunta 88.

☐

Não realizada

Ir para a pergunta 91.

PCR dosada

88. Resultado (PCR) *

(mg/L)

89. Sensibilidade *

Marcar apenas uma oval.

☐

Convencional

☐

Ultra sensível

90. Valor de referência (PCR) *

Resposta ao tratamento

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

Marcar apenas uma oval.

☐

Sim

Ir para a pergunta 92.

☐

Não

Ir para a pergunta 95.

Resposta ao tratamento

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

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

94. Tempo necessário de tratamento para redução da HbA1c *

Informar número de dias ou meses ou anos

Peptídeo C no seguimento

95. Possui exame de Peptídeo C após 3 anos do diagnóstico de DM? *

Marcar apenas uma oval.

☐ Sim

☐ Não *Ir para a pergunta 100.*

Dados laboratoriais APÓS 3 ANOS do diagnóstico de DM**96. Data de realização dos exames ***

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

97. Peptídeo C de jejum (ng/mL) *

(após 3 anos do diagnóstico de DM)

98. Glicemia de jejum (mg/dL) *

(concomitante à dosagem do peptídeo C)

99. HbA1c (%) *

(concomitante à dosagem do peptídeo C)

Seguimento laboratorial**100. Possui dados laboratoriais de seguimento? ***

(ex: glicemia, HbA1c)

Marcar apenas uma oval.

☐ Sim *Ir para a pergunta 101.*

☐ Não *Ir para a pergunta 111.*

Dados laboratoriais de seguimento

(Após o início do tratamento)

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Variação da glicemia de jejum**103. Glicemia mínima ***

(mg/dL)

104. **Glicemia máxima ***
(mg/dL)

Variação de insulinemia de jejum

105. **Insulinemia mínima**
(μ U/mL)

106. **Insulinemia máxima**
(μ U/mL)

Variação de peptídeo C de jejum

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

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

Variação de HbA1c

109. **HbA1c mínima ***
(%)

110. **HbA1c máxima ***
(%)

Complicações do diabetes

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

☐

Sim

☐

Não

☐

Investigação diagnóstica não realizada

112. **Fundoscopia**

113. Data da Fundoscopia

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

114. Nefropatia diabética *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Investigação diagnóstica não realizada

115. Microalbuminúria (mg/g de creatinina ou mg/min ou mg/24h)**116. Data da microalbuminúria**

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

117. Neuropatia diabética *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Investigação diagnóstica não realizada

118. 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

119. Investigação do perfil lipídico *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Realizada *Ir para a pergunta 120.*
- ☐ Não realizada *Ir para a pergunta 125.*

Perfil lipídico e ácido úrico

120. Colesterol total *

(mg/dL)

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

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

123. **Triglicerídeos ***
(mg/dL)

124. **Ácido Úrico**
(mg/dL)

Avaliação laboratorial renal

125. **Investigação laboratorial renal ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Realizada *Ir para a pergunta 126.*
☐ Não realizada *Ir para a pergunta 128.*

Avaliação laboratorial renal

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

127. **Uréia**
(mg/dL)

Alterações renais

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

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim
☐ Não *Ir para a pergunta 131.*
☐ Investigação diagnóstica não realizada *Ir para a pergunta 131.*

Alterações renais

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

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

130. 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

131. Investigação laboratorial hepática **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Realizada
- ☐ Não realizada *Ir para a pergunta 136.*

Perfil hepático

132. TGO/AST *

(U/L)

133. TGP/ALT *

(U/L)

134. FA (Fosfatase Alcalina)

(U/L)

135. Gama-GT

(U/L)

Alterações extra-pancreáticas

136. 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: _____

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

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

Outras informações

Relatar qualquer outra informação que julgar necessária para a interpretação do caso

138. Informações adicionais

Powered by

Google Forms

Anexo B - Questionário MODY - Dados Clínico-laboratoriais - Rastreamento**Questionário MODY - Dados Clínico-laboratoriais - Rastreamento**

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. CRM do médico solicitante *

7. Email de contato do médico solicitante *

8. Telefone de contato do médico solicitante

(DDD) número do telefone

**9. Grau de parentesco em relação ao caso
índice ***

10. Data do nascimento *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

11. Idade atual *

(anos)

12. Nome do caso índice *

(primeiro familiar investigado)

13. Possui diabetes ou pré-diabetes (glicemia de jejum alterada ou intolerância à glicose)? **Marcar apenas uma oval.*☐

Sim

Ir para a pergunta 20.☐

Não

*Ir para a pergunta 14.***Dados laboratoriais****14. Data aproximada da coleta para a realização dos exames laboratoriais abaixo (paciente não diabético)***Exemplo: 15 de dezembro de 2012*

15. Glicemia de jejum (paciente não diabético) *

(mg/dL)

16. Hemoglobina glicada (HbA1c) (paciente não diabético) *

(%)

17. Método (HbA1c) (paciente não diabético)*Marcar apenas uma oval.*☐

Imunoturbidimetria

☐

HPLC

18. Insulinemia de jejum (paciente não diabético)

(μU/mL)

19. Peptídeo C de jejum (paciente não diabético)

(ng/mL)

*Pare de preencher este formulário.***Paciente com história de DM ou pré-diabetes****20. Idade ao diagnóstico de diabetes ou pré-diabetes ***

(anos)

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

- ☐ Baixo peso
- ☐ Peso normal
- ☐ Sobrepeso
- ☐ Obesidade

22. IMC atual **(kg/m²)*

23. Tipo de diabetes referido **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ DM1
- ☐ DM2
- ☐ não sabe o tipo

24. Associações clínicas **Marque todas que se aplicam.*

- ☐ Hipertensão arterial sistêmica
- ☐ Dislipidemia
- ☐ Obesidade central
- ☐ Acanthose nigricans
- ☐ Hipoacusia / Surdez
- ☐ Nenhuma das anteriores
- ☐ Outro:

Ir para a pergunta 25.

Tratamento do diabetes ou pré-diabetes

25. Tratamento na época do diagnóstico de diabetes ou pré-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. Tratamento atual *

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

Ir para a pergunta 27.

Dados laboratoriais**27. Data aproximada da coleta para a realização dos exames laboratoriais abaixo**

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

28. Glicemia de jejum *

(mg/dL)

29. Insulinemia de jejum

(μ U/mL)

30. Peptídeo C de jejum

(ng/mL)

31. Peptídeo C pós-prandial

(ng/mL)

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

HbA1c

33. Hemoglobina glicada (HbA1c) *

(%)

34. Método (HbA1c)*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Imunoturbidimetria
- ☐ HPLC

Teste de tolerância oral à glicose

35. Glicemia basal (0 minutos)

(mg/dL)

36. Glicemia aos 120 minutos

(mg/dL)

Anticorpo anti-GAD**37. Anticorpo anti-GAD ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Positivo *Ir para a pergunta 38.*
- ☐ Negativo *Ir para a pergunta 41.*
- ☐ Não realizado *Ir para a pergunta 41.*

Anti-GAD positivo**38. Título (anti-GAD) ***

(U/L)

39. Método (anti-GAD)*Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Radioimunoensaio (RIA)
- ☐ ELISA

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

Anticorpo anti-tirosina fosfatase (IA2)**41. Anticorpo anti-IA2 ****Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Positivo *Ir para a pergunta 42.*
- ☐ Negativo *Ir para a pergunta 45.*
- ☐ Não realizado *Ir para a pergunta 45.*

Anti-IA2 positivo

42. **Título (IA2) ***
(U/L)

43. **Método (IA2)**

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Radioimunoensaio (RIA)
- ☐ ELISA

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

Anticorpo anti-insulina (IAA)

45. **Anticorpo anti-IAA ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Positivo *Ir para a pergunta 46.*
- ☐ Negativo *Ir para a pergunta 49.*
- ☐ Não realizado *Ir para a pergunta 49.*

Anti-IAA positivo

46. **Título (IAA) ***
(U/L)

47. **Método (IAA)**

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Radioimunoensaio (RIA)
- ☐ ELISA

48. **Valor de referência utilizado (IAA) ***

Proteína C reativa (PCR)

49. **Dosagem (PCR) ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Realizada *Ir para a pergunta 50.*
- ☐ Não realizada *Ir para a pergunta 53.*

PCR dosada

50. **Resultado (PCR) ***

(mg/L)

51. **Sensibilidade ****Marcar apenas uma oval.*☐

Convencional

☐

Ultra sensível

52. **Valor de referência (PCR) ***

Perfil lipídico

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

53. **Investigação do perfil lipídico ****Marcar apenas uma oval.*☐

Realizada

Ir para a pergunta 54.☐

Não realizada

*Ir para a pergunta 58.***Perfil lipídico e ácido úrico**

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

54. **HDL ***

(mg/dL)

55. **LDL ***

(mg/dL)

56. **Triglicerídeos ***

(mg/dL)

57. **Ácido Úrico**

(mg/dL)

Avaliação laboratorial renal

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

58. **Investigação laboratorial renal ****Marcar apenas uma oval.*☐

Realizada

Ir para a pergunta 59.☐

Não realizada

Ir para a pergunta 61.

Avaliação laboratorial renal

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

59. **Creatinina ***

(mg/dL)

60. **Uréia**

(mg/dL)

Alterações renais

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

Marcar apenas uma oval.

☐ Sim

☐ Não *Ir para a pergunta 64.*

☐ Investigação diagnóstica não realizada *Ir para a pergunta 64.*

Alterações renais

62. **Alterações renais ***

Marque todas que se aplicam.

☐ Disfunção renal

☐ Múltiplos cistos renais

☐ Hipoplasia renal

☐ Dilatação pielocalicial não obstrutiva

☐ Doença glomerulocística

☐ Outro: _____

63. **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)

64. **Investigação laboratorial hepática ***

Marcar apenas uma oval.

☐ Realizada

☐ Não realizada *Ir para a pergunta 69.*

Perfil hepático

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

65. **TGO/AST ***

(U/L)

66. **TGP/ALT ***

(U/L)

67. **FA (Fosfatase Alcalina)**

(U/L)

68. **Gama-GT**

(U/L)

Alterações extra-pancreáticas69. **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: _____

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

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

Seguimento laboratorial71. **Possui dados laboratoriais de seguimento? ***

(ex: glicemia, HbA1c)

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Sim *Ir para a pergunta 72.*
- ☐ Não *Ir para a pergunta 81.*

Dados laboratoriais de seguimento

(após o início do tratamento)

72. Data do início do seguimento no serviço de origem

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Variação da glicemia de jejum

73. Glicemia mínima *

(mg/dL)

74. Glicemia máxima *

(mg/dL)

Variação de insulinemia de jejum

75. Insulinemia mínima

(μ U/mL)

76. Insulinemia máxima

(μ U/mL)

Variação de peptídeo C de jejum

77. Peptídeo C de jejum mínimo

(ng/mL)

78. Peptídeo C de jejum máximo

(ng/mL)

Variação de HbA1c

79. HbA1c mínima *

(%)

80. HbA1c máxima *

(%)

Complicações do diabetes

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

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Investigação diagnóstica não realizada

82. Fundoscopia*(em caso positivo)*

83. Nefropatia diabética **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Investigação diagnóstica não realizada

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

85. Neuropatia diabética **Marcar apenas uma oval.*

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Investigação diagnóstica não realizada

86. Complicações macrovasculares **Marque todas que se aplicam.*

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

Powered by

Google Forms

Anexo C - Primers utilizados durante a investigação genético-molecular

Sequência	Éxon	Sentido	Tamanho (pb)	TM (°C)	%GC	Produto (pb)
GCK						
CCGACTCGTTGGAGAACAAT	1	F	20	58	50	356
CCTTCTCAAAGAGCCTGTGC	1	R	20	59	50	
GTGTGCAGATGCCTGGTG	2	F	18	59	61	391
CCCAAGTCGAGGACTTCAT TGCTC	2	R	24	63	54	
TTGTCCAGCTCCCTTAGTCC	3	F	20	59	55	356
GACTAGCTGGGCCCTGAGAT	3	R	20	60	60	
TTGCAGTGTCCCTGAGGAAT	4	F	20	59	50	355
AGGTGACATGGCCACAATTT	4	R	20	58	45	
CGTTCCCAAACCTCTCAAA	5-6	F	20	45	50	594
ACCAGGCTCTGCTCTGACAT	5-6	R	20	55	45	
CCATTGTTCCAGACAAAGC AGAGA	7	F	24	61	46	400
CAAGCCCATTATCTGCAATG	7	R	20	55	45	
GACCTCAGTGGGGAGCAGT	8	F	19	61	63	376
AGGCCCTAGTTTCCCATCC	8	R	19	58	58	
GCTCAGCGAGGGAAAGAG	9-10	F	18	57	61	811
ACGTGTGGGGAGCACTTC	9-10	R	18	59	61	
HNF1A						
TGCAAGGAGTTTGGTTTGTG	1	F	20	57	45	528
TGGGGACTCAACTCAGAAGG	1	R	20	59	55	
CCTCAGGGTTGACAAGGTTC	2	F	20	58	55	395
TGTGTAATGGGGATGGTGAA	2	R	20	56	45	
AAGAATCAAGGGCAAGGTCA	3	F	20	57	45	372
GGCAACTGGACAGCCTTTTA	3	R	20	58	50	
GGCAGAGCTCAGCTTCTCAG	4	F	20	60	60	464
AAGGAGTGGCATGAATGGAA	4	R	20	57	45	
CTGGCCTAAGCAAACCAATG	5	F	20	57	50	324
GGGACTGCTCCAGAATCTCC	5	R	20	59	60	
CCAACCTCATCTTTCCTTGG	6	F	20	56	50	600
AACATCAGTCCCCCTTACCC	6	R	20	59	55	
CTCTGGGAAGGAGAGGTGGT	7	F	20	60	60	491
CTGCTCACACAAGCAGTCGT	7	R	20	61	55	
AGTCTTGAGGCCTGGGACTA	8-9	F	20	59	55	497
AAGGGGTGGGACCAACAT	8-9	R	18	58	56	
CCCCATCCTGAGTACCCCTA	10	F	20	59	60	573
GTCCCAGGGGCTCTCCATAG	10	R	19	59	63	

Anexo D - Critérios de classificação da *The American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e *The Association for Molecular Pathology* (AMP) (82)

Evidência	Categoria	
Patogenicidade		
Muito forte	PVS1	Variante que comprometa completamente a função proteica (null) em um gene cuja a perda de função (LOF) é um mecanismo de doença conhecido - nonsense / frameshift / sítios de <i>splicing</i> ± 1 ou 2 / códon inicial / deleções de éxons
Forte	PS1	Mesma alteração de aminoácido que uma variante antes descrita como patogênica, independentemente da troca de nucleotídeos
	PS2	Variante de novo (com paternidade e maternidade confirmadas)
	PS3	Estudos funcionais (<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>) que demonstrem um efeito deletério da variante no gene ou em seu produto
	PS4	A prevalência da variante em indivíduos afetados é maior do que a observada em controles
Moderada	PM1	Variante localizada em um hot spot e, ou um domínio proteico importante em que não foram mapeadas variantes frequentes
	PM2	Variante ausente em controles (ou em uma frequência extremamente baixa - doenças recessivas) em bancos de dados genômicos como <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1.000 Genomes Project</i> ou <i>Exome Aggregation Consortium</i>
	PM3	Variante detectada em <i>trans</i> com uma variante patogênica (doenças recessivas)
	PM4	Modificação do tamanho do produto proteico em consequência de deleções/inserções <i>in-frame</i> em uma região não repetitiva ou variantes do tipo stop-loss
	PM5	Nova variante <i>missense</i> em uma posição (resíduo) em que outra variante <i>missense</i> já foi descrita como patogênica
	PM6	Variante de novo (sem paternidade e maternidade confirmadas)
Corroborante	PP1*	Cossegregação com a doença em inúmeros membros afetados de uma família em um gene definitivamente conhecido com causador do fenótipo

Evidência	Categoria	
Corroborante	PP2	Variantes <i>missense</i> em um gene que possui baixas taxas de variantes <i>missense</i> benignas e no qual esse tipo de variante é um mecanismo comum de doença
	PP3	Análise <i>in silico</i> da variante em preditores indica um comprometimento do gene ou de seu produto
	PP4	Fenótipo do paciente ou história familiar é altamente específica para uma doença com uma única etiologia genética
	PP5	Fontes confiáveis relataram a variante, recentemente, como patogênica
Benignidade		
<i>Stand-alone</i>	BA1	Frequência alélica >5% em bancos de dados genômicos como <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1.000 Genomes Project</i> ou <i>Exome Aggregation Consortium</i>
Forte	BS1	Frequência alélica em bancos de dados genômicos é maior do que a esperada para a doença
	BS2	Variante identificada em um indivíduo adulto saudável para doenças recessivas (homozigoto), dominante (heterozigoto) ou ligada ao X (hemizigoto) cuja penetrância completa seria esperada em idade jovem
	BS3	Estudos funcionais (<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>) que não demonstrem um efeito deletério da variante no gene ou em seu produto
	BS4	Cossegregação com a doença ausente em membros afetados de uma família
Corroborante	BP1	Variantes <i>missense</i> em um gene no qual variantes <i>nonsense</i> são a principal causa conhecida de doença
	BP2	Variante detectada em <i>trans</i> com uma variante patogênica para uma doença com padrão de herança dominante e penetrância completa ou em <i>cis</i> com variante patogênica em qualquer padrão de herança
	BP3	Deleções/inserções <i>in-frame</i> em uma região repetitiva sem função conhecida
	BP4	Análise <i>in silico</i> da variante em preditores não indicam comprometimento do gene ou de seu produto
	BP5	Variante identificada em um caso com uma base molecular alternativa que explique o fenótipo
	BP6	Fontes confiáveis relataram a variante, recentemente, como benigna
	BP7	Variante silenciosa (sinônima) para a qual os preditores <i>in silico</i> não indicam impacto no sítio de <i>splicing</i> ou o surgimento de um novo sítio de <i>splicing</i> em uma posição que não seja altamente conservada

* Pode ser utilizado como evidência moderada ou forte pelo aumento dos dados de cossegregação (indivíduos rastreados) (100);
LOF: *loss of function*

Anexo E - Heredogramas

A

Anexo E – Heredogramas de famílias com variantes não descritas e, ou, trios/filhos dos probandos investigados.

A - MODY-*GCK* e B - MODY-*HNF1A*

Quadrado: gênero masculino / Círculo: gênero feminino

Símbolos preenchidos com cinza: pacientes com hiperglicemia leve de jejum; Símbolos preenchidos com preto: pacientes com diabetes;

Símbolos vazios: pacientes sem diabetes/hiperglicemia leve de jejum; *: pacientes com pré-diabetes

WT: alelo selvagem; MT: alelo alterado; DM2: Diabetes Tipo 2; -/-: pacientes não genotipados

Anexo F - Artigo - Clinical application of ACMG-AMP guidelines in *HNF1A* and *GCK* variants in a cohort of MODY families - Clinical Genetics

Received: 18 November 2016 | Revised: 31 January 2017 | Accepted: 1 February 2017

DOI: 10.1111/cge.12988

WILEY CLINICAL GENETICS

ORIGINAL ARTICLE

Clinical application of ACMG-AMP guidelines in *HNF1A* and *GCK* variants in a cohort of MODY families

L.S. Santana¹ | L.A. Caetano^{1,2} | A.D. Costa-Riquetto^{1,2} | E.P.S. Quedas¹ | M. Nery² | P. Collett-Solberg³ | M.C.S. Boguszewski⁴ | M.F. Vendramini⁵ | L.G. Crisostomo^{6,7} | F.O. Floh⁶ | Z.I. Zarabia⁸ | S.K. Kohara⁹ | L. Guastapaglia¹⁰ | C.G.B. Passone¹¹ | L.E. Sewaybricker¹² | A.A.L. Jorge¹ | M.G. Teles^{1,2}

¹Monogenic Diabetes Group, Genetic Endocrinology Unit and Laboratory of Molecular & Cellular Endocrinology/LIM25, School of Medicine, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, SP, Brazil

²Diabetes Unit, Clinics Hospital, School of Medicine, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, SP, Brazil

³Department of Endocrinology, University of Rio de Janeiro State (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Departamento de Pediatria, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

⁵Serviço de Endocrinologia, Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo (HSPPE-SP), Sao Paulo, SP, Brazil

⁶Serviço de Endocrinologia, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, SP, Brazil

⁷Faculdade de Medicina, Centro Universitário São Camilo, Sao Paulo, SP, Brazil

⁸Serviço de Endocrinologia, Hospital Infantil Dr. Jeser Amarante Faria, Joinville, SC, Brazil

⁹Serviço de Endocrinologia, Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Joinville, SC, Brazil

¹⁰Serviço de Endocrinologia, Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo (HSPM-SP), Sao Paulo, SP, Brazil

¹¹Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Sao Paulo, SP, Brazil

¹²Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Correspondence

Milena G. Teles, Monogenic Diabetes Group, Genetic Endocrinology Unit, University of Sao Paulo, Dr Arnaldo Avenue, 455, 5th floor, Room 5340, 01246-903 Sao Paulo, Brazil. Email: milena.teles@usp.br

Funding information

Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award number: 2013/19920-2; Coordination for

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a form of monogenic diabetes with autosomal dominant inheritance. *GCK*-MODY and *HNF1A*-MODY are the prevalent subtypes. Currently, there is growing concern regarding the correct interpretation of molecular genetic findings. The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) updated guidelines to interpret and classify molecular variants. This study aimed to determine the prevalence of MODY (*GCK*/*HNF1A*) in a large cohort of Brazilian families, to report variants related to phenotype, and to classify them according to ACMG guidelines. One hundred and nine probands were investigated, 45% with clinical suspicion of *GCK*-MODY and 55% with suspicion of *HNF1A*-MODY. Twenty-five different variants were identified in *GCK* gene (30 probands—61% of positivity), and 7 variants in *HNF1A* (10 probands—17% of positivity). Fourteen of them were novel (12—*GCK*/2—*HNF1A*). ACMG guidelines were able to classify a large portion of variants as pathogenic (36%—*GCK*/86%—*HNF1A*) and likely pathogenic (44%—*GCK*/14%—*HNF1A*), with 16% (5/32) as uncertain significance. This allows us to determine the pathogenicity classification more efficiently, and also reinforces the suspected associations with the phenotype among novel variants.

KEYWORDS

ACMG, *GCK*, *HNF1A*, MODY

9 REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2014 Jan 1;37 Suppl 1(Supplement_1):S14-80.
2. Groop L, Pociot F. Genetics of diabetes - Are we missing the genes or the disease? *Mol Cell Endocrinol*. Elsevier Ireland Ltd; 2014 Jan 25;382(1):726–39.
3. Tattersall RB, Fajans SS. A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes*. 1975 Jan;24(1):44–53.
4. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Dechaume A, Huyvaert M, Montagne L, et al. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. Brusgaard K, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2012 Jan;7(6):e37423.
5. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*. 2001 Sep 27;345(13):971–80.
6. Costantini S, Prandini P, Corradi M, Pasquali A, Contreas G, Pignatti PF, et al. A novel synonymous substitution in the GCK gene causes aberrant splicing in an Italian patient with GCK-MODY phenotype. Vol. 92, *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011.
7. Bonatto N, Nogaroto V. Variants of the HNF1 α gene: a molecular approach concerning diabetic patients from southern Brazil. *Genet Mol Biol*. 2012;35(4):737–40.
8. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*. 1996 Dec 5;384(6608):458–60.
9. Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1992 Mar 12;356(6365):162–4.
10. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*. 1996 Dec 5;384(6608):455–8.
11. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet*. 1997 Oct;17(2):138–9.

12. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet.* 1997 Dec;17(4):384–5.
13. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 1999 Nov;23(3):323–8.
14. Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, et al. Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 29;102(13):4807–12.
15. Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, et al. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet.* 2006 Jan;38(1):54–62.
16. Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawee N, Doi A, Furuta H, Nishi M, et al. PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jul;92(7):2821–6.
17. Edghill EL, Flanagan SE, Patch A-MA-M, 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 Apr 1;57(4):1034–42.
18. Borowiec M, Liew CW, Thompson R, Boonyasrisawat W, Hu J, Mlynarski WM, et al. Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 25;106(34):14460–5.
19. Bowman P, Flanagan SE, Edghill EL, Damhuis A, Shepherd MH, Paisey R, et al. Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. *Diabetologia.* 2012 Jan;55(1):123–7.
20. Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A, Ludovico O, Buranasupkajorn P, Mazza T, et al. Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus. *Am J Hum Genet.* The American Society of Human Genetics; 2015 Jul 2;97(1):177–85.
21. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia.* 2008 Apr;51(4):546–53.
22. Furuzawa GK, Giuffrida FM a, Oliveira CS V, Chacra AR, Dib S a, Reis AF. Low prevalence of MODY2 and MODY3 mutations in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008 Sep;81(3):e12-4.

23. Shepherd M, Ellis I, Ahmad AM, Todd PJ, Bowen-Jones D, Mannion G, et al. Predictive genetic testing in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med*. 2001 May;18(5):417–21.
24. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, et al. beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes*. 2001 Feb;50 Suppl 1:S94-100.
25. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*. 2010 Dec;53(12):2504–8.
26. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 7th ed. 2015. 52 p.
27. Velho G, Blanché H, Vaxillaire M, Bellanné-Chantelot C, Pardini VC, Timsit J, et al. Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia*. 1997 Mar;40(2):217–24.
28. Chèvre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanché H, Vionnet N, et al. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia*. 1998 Sep;41(9):1017–23.
29. Moises RS, Reis AF, Morel V, Chacra AR, Dib SA, Bellanne-Chantelot C, et al. Prevalence of Maturity-Onset Diabetes of the Young Mutations in Brazilian Families With Autosomal- Dominant Early-Onset Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Apr 1;24(4):786–8.
30. Maraschin J de F, Kannengiesser C, Murussi N, Campagnolo N, Canani LH, Gross JL, et al. HNF1 α mutations are present in half of clinically defined MODY patients in South-Brazilian individuals. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Nov;52(8):1326–31.
31. Lerario AM, Brito LP, Mariani BM, Fragoso MCB V, Machado MAC, Teixeira R. A missense TCF1 mutation in a patient with mody-3 and liver adenomatosis. *Clinics*. 2010;65(10):1059–60.
32. Nogaroto V, Svidnicki PV, Bonatto N, Milléo FQ, de Almeida MC, Vicari MR, et al. New HNF-1 α nonsense mutation causes maturity-onset diabetes of the young type 3. *Clinics*. 2011;66(1):167–8.
33. Caetano LA, Jorge AAL, Malaquias AC, Trarbach EB, Queiroz MS, Nery M, et al. Incidental mild hyperglycemia in children: two MODY 2 families identified in Brazilian subjects. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012 Nov;56(8):519–24.
34. DellaManna T, Silva MR da, Chacra AR, Kunii IS, Rolim AL, Furuzawa G, et al. Clinical follow-up of two Brazilian subjects with glucokinase-MODY (MODY2) with description of a novel mutation. *Arq Bras Endocrinol*

- Metabol. 2012 Nov;56(8):490–5.
35. Giuffrida FM a, Calliari LE, Manna T Della, Ferreira JG, Saddi-Rosa P, Kunii IS, et al. A novel glucokinase deletion (p.Lys32del) and five previously described mutations co-segregate with the phenotype of mild familial hyperglycaemia (MODY2) in Brazilian families. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013 May;100(2):e42-5.
 36. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, Ellard S, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat.* 2009 Nov;30(11):1512–26.
 37. Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, et al. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet (London, England).* 1992 May 30;339(8805):1307–10.
 38. Costantini S, Malerba G, Contreas G, Corradi M, Marin Vargas SP, Giorgetti A, et al. Genetic and bioinformatics analysis of four novel GCK missense variants detected in Caucasian families with GCK-MODY phenotype. *Clin Genet.* 2015 May;87(5):440–7.
 39. Carmody D, Lindauer KL, Naylor RN. Adolescent non-adherence reveals a genetic cause for diabetes. *Diabet Med.* 2015 Jun;32(6):e20-3.
 40. Stride A, Shields B, Gill-Carey O, Chakera AJ, Colclough K, Ellard S, et al. Cross-sectional and longitudinal studies suggest pharmacological treatment used in patients with glucokinase mutations does not alter glycaemia. *Diabetologia.* 2014 Jan;57(1):54–6.
 41. Shammas C, Neocleous V, Phelan MM, Lian L-Y, Skordis N, Phylactou LA. A report of 2 new cases of MODY2 and review of the literature: Implications in the search for type 2 Diabetes drugs. *Metabolism.* Elsevier Inc.; 2013 Nov;62(11):1535–42.
 42. Colclough K, Saint-Martin C, Timsit J, Ellard S, Bellanné-Chantelot C. Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *Eur J Hum Genet.* Macmillan Publishers Limited; 2014 Oct;22(10):1–6.
 43. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan 1;42(Database issue):D749-55.
 44. Gloyn AL. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat.* 2003 Nov;22(5):353–62.
 45. Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki JI, Nagata Y. Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure.* 2004;12(3):429–38.

46. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Apr;4(4):200–13.
47. Inoue M, Sakuraba Y, Motegi H, Kubota N, Toki H, Matsui J, et al. A series of maturity onset diabetes of the young, type 2 (MODY2) mouse models generated by a large-scale ENU mutagenesis program. *Hum Mol Genet.* 2004 Jun 1;13(11):1147–57.
48. Stanik J, Dusatkova P, Cinek O, Valentinova L, Huckova M, Skopkova M, et al. De novo mutations of GCK, HNF1A and HNF4A may be more frequent in MODY than previously assumed. *Diabetologia.* 2014 Mar;57(3):480–4.
49. Stride A, Vaxillaire M, Tuomi T, Barbetti F, Njølstad PR, Hansen T, et al. The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia.* 2002;45(3):427–35.
50. Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, et al. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nat Genet.* 1995 Apr;9(4):418–23.
51. Bacon S, Kyithar MP, Schmid J, Rizvi SR, Bonner C, Graf R, et al. Serum levels of pancreatic stone protein (PSP)/reg1A as an indicator of beta-cell apoptosis suggest an increased apoptosis rate in hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A-MODY) carriers from the third decade of life onward. *BMC Endocr Disord. BMC Endocrine Disorders;* 2012 Dec 18;12(1):13.
52. Stride A, Ellard S, Clark P, Shakespeare L, Salzmann M, Shepherd M, et al. Beta-cell dysfunction, insulin sensitivity, and glycosuria precede diabetes in hepatocyte nuclear factor-1alpha mutation carriers. *Diabetes Care.* 2005;28(7):1751–6.
53. McDonald TJ, Shields BM, Lawry J, Owen KR, Gloyn AL, Ellard S, et al. High-sensitivity CRP discriminates HNF1A-MODY from other subtypes of diabetes. *Diabetes Care.* 2011;34(8):1860–2.
54. Pearson ER, Liddell WG, Shepherd M, Corral RJ, Hattersley AT. Sensitivity to sulphonylureas in patients with hepatocyte nuclear factor-1α gene mutations: Evidence for pharmacogenetics in diabetes. *Diabet Med.* 2000;17(7):543–5.
55. Shepherd M, Sparkes AC, Hattersley AT. Genetic testing in maturity onset diabetes of the young (MODY): a new challenge for the diabetic clinic. *Pract Diabetes Int.* 2001 Jan;18(1):16–21.
56. Frayling TM, Bulamn MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie AD, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K.

- Diabetes. 1997 Apr;46(4):720–5.
57. Kyithar MP, Bacon S, Pannu KK, Rizvi SR, Colclough K, Ellard S, et al. Identification of HNF1A-MODY and HNF4A-MODY in Irish families: phenotypic characteristics and therapeutic implications. *Diabetes Metab.* 2011 Dec;37(6):512–9.
 58. Awa WL, Thon A, Raile K, Grulich-Henn J, Meissner T, Schober E, et al. Genetic and clinical characteristics of patients with HNF1A gene variations from the German-Austrian DPV database. *Eur J Endocrinol.* 2011 Apr 1;164(4):513–20.
 59. Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, Lindgren C, Lipsanen-Nyman M, Weng J, et al. High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia.* 1999 Oct;42(9):1131–7.
 60. Søvik O, Irgens HU, Molnes J, Sagen J V., Bjørkhaug L, Ræder H, et al. Monogenic diabetes mellitus in Norway. *Nor Epidemiol.* 2013;23(1):55–60.
 61. Pruhova S, Ek J, Lebl J, Sumnik Z, Saudek F, Andel M, et al. Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha. *Diabetologia.* 2003 Mar;46(2):291–5.
 62. Colclough K, Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, Flanagan SE, Ellard S. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha and 4 alpha in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat.* 2013 May;34(5):669–85.
 63. Costa A, Bescos M, Velho G, Chevre J, Vidal J, Sesmilo G, et al. Genetic and clinical characterisation of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families. *Eur J Endocrinol.* 2000 Apr 1;142(4):380–6.
 64. Estalella I, Rica I, Perez de Nanclares G, Bilbao JR, Vazquez JA, San Pedro JI, et al. Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Oct;67(4):538–46.
 65. Glucksmann MA, Lehto M, Tayber O, Scotti S, Berkemeier L, Pulido JC, et al. Novel mutations and a mutational hotspot in the MODY3 gene. *Diabetes.* 1997 Jun;46(6):1081–6.
 66. Xu JY, Dan QH, Chan V, Wat NMS, Tam S, Tiu SC, et al. Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. *Eur J Hum Genet.* 2005 Apr 15;13(4):422–7.
 67. Iwasaki N, Oda N, Ogata M, Hara M, Hinokio Y, Oda Y, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha/MODY3 gene in Japanese subjects

- with early- and late-onset NIDDM. *Diabetes*. 1997 Sep;46(9):1504–8.
68. Tonooka N, Tomura H, Takahashi Y, Onigata K, Kikuchi N, Horikawa Y, et al. High frequency of mutations in the HNF-1alpha gene in non-obese patients with diabetes of youth in Japanese and identification of a case of digenic inheritance. *Diabetologia*. 2002 Dec;45(12):1709–12.
 69. Tatsi C, Kanaka-Gantenbein C, Vazeou-Gerassimidi A, Chrysis D, Delis D, Tentolouris N, et al. The spectrum of HNF1A gene mutations in Greek patients with MODY3: relative frequency and identification of seven novel germline mutations. *Pediatr Diabetes*. 2013 Nov;14(7):526–34.
 70. Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D, Collin P, Daumont M, Douillard C, et al. Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes*. 2005 Nov;54(11):3126–32.
 71. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463–7.
 72. Schouten JP. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):57e–57.
 73. Stenson PD, Mort M, Ball E V, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*. 2014 Jan 28;133(1):1–9.
 74. 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 Sep 15;56(9):1958–63.
 75. Ellard S, De Franco E. Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Monogenic Diabetes and Discovery of Novel Aetiologies. In 2014. p. 71–86.
 76. Alkorta-Aranburu G, Carmody D, Cheng YWW, Nelakuditi V, Ma L, Dickens JT, et al. Phenotypic heterogeneity in monogenic diabetes: the clinical and diagnostic utility of a gene panel-based next-generation sequencing approach. *Mol Genet Metab*. 2014 Dec 28;113(4):315–20.
 77. Szopa M, Ludwig-Gałęzowska A, Radkowski P, Skupień J, Zapala B, Piatek T, et al. Genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing in patients with maturity-onset diabetes of the young. *Pol Arch Med Wewnętrznej*. 2015 Nov 27;125(11):845–51.
 78. Chapla A, Mruthyunjaya MD, Asha HS, Varghese D, Varshney M, Vasan SK, et al. Maturity onset diabetes of the young in India - A distinctive

- mutation pattern identified through targeted next-generation sequencing. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(4):533–42.
79. Anık A, Çatlı G, Abacı A, Sarı E, Yeşilkaya E, Korkmaz HA, et al. Molecular diagnosis of maturity-onset diabetes of the young (MODY) in Turkish children by using targeted next-generation sequencing. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015 Jun 30;28:1265.
 80. Carvalho M da CG de, Silva D da. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*. 2010;735–44.
 81. Dorschner MO, Amendola LM, Turner EH, Robertson PD, Shirts BH, Gallego CJ, et al. Actionable, pathogenic incidental findings in 1,000 participants' exomes. *Am J Hum Genet*. 2013 Oct 3;93(4):631–40.
 82. 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 May 5;17(5):405–23.
 83. Wallis Y, Payne S, Mcanulty C, Bodmer D, Sister- E, Robertson K, et al. Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics. 2013;(September).
 84. Santana LS de, Caetano LA, Jorge AAL, Teles MG. Questionário eletrônico para MODY: otimização da coleta de dados. *Arq Bras Endocrinol Metab*. Guarujá; 2014;58((supl 3)):S125.
 85. Thanabalasingham G, Pal A, Selwood MP, Dudley C, Fisher K, Bingley PJ, et al. Systematic assessment of etiology in adults with a clinical diagnosis of young-onset type 2 diabetes is a successful strategy for identifying maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care*. 2012 Jun;35(6):1206–12.
 86. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.
 87. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487–91.
 88. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May 25;94(3):441–8.
 89. Russell DW, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed.

- Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 999 p.
90. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012 Jun 18;13:134.
 91. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2010 Aug;7(8):575–6.
 92. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248–9.
 93. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res*. 2011 Sep 1;39(17):e118.
 94. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009 Jan;4(7):1073–81.
 95. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009 May;37(9):e67.
 96. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*. 1997 Jan;4(3):311–23.
 97. Divina P, Kvitkovicova A, Buratti E, Vorechovsky I. Ab initio prediction of mutation-induced cryptic splice-site activation and exon skipping. *Eur J Hum Genet*. 2009 Jun;17(6):759–65.
 98. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 1;29(1):308–11.
 99. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. Cold Spring Harbor Labs Journals; 2016 Aug 17;536(7616):285–91.
 100. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet*. 2016 Jun 2;98(6):1077–81.
 101. R Foundation for Statistical Computing. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2015.

102. Massa O, Meschi F, Cuesta-Munoz A, Caumo A, Cerutti F, Toni S, et al. High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. *Diabetologia*. 2001 Jul;44(7):898–905.
103. Shimada F, Makino H, Hashimoto N, Taira M, Seino S, Bell GI, et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus associated with a mutation of the glucokinase gene in a Japanese family. *Diabetologia*. 1993 May;36(5):433–7.
104. Ellard S, Beards F, Allen LI, Shepherd M, Ballantyne E, Harvey R, et al. A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. *Diabetologia*. 2000 Feb;43(2):250–3.
105. Bertini C, Maioli M, Fresu P, Tonolo G, Pirastu M. A new missense mutation in the glucokinase gene in an Italian Mody family. In: *Diabetologia*. 1996. p. 1413–4.
106. Guazzini B, Gaffi D, Mainieri D, Multari G, Cordera R, Bertolini S, et al. Three novel missense mutations in the glucokinase gene (G80S; E221K; G227C) in Italian subjects with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Mutations in brief* no. 162. Online. *Hum Mutat*. 1998 Jan;12(2):136.
107. Solera J, Arias P, Amiñoso C, González-Casado I, Garre P, Herranz L, et al. Identification of eight new mutations in the GCK gene by DHPLC screening in a Spanish population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009 Jul;85(1):20–3.
108. Thomson KL, Gloyn AL, Colclough K, Batten M, Allen LIS, Beards F, et al. Identification of 21 novel glucokinase (GCK) mutations in UK and European Caucasians with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat*. 2003 Dec;22(5):417.
109. Bjørkhaug L, Ye H, Horikawa Y, Søvik O, Molven A, Njølstad PR. MODY associated with two novel hepatocyte nuclear factor-1alpha loss-of-function mutations (P112L and Q466X). *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Dec 29;279(3):792–8.
110. Vaxillaire M, Rouard M, Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Boriraj VV, et al. Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Hum Mol Genet*. 1997 Apr 1;6(4):583–6.
111. Bellanné-Chantelot C, Carette C, Riveline J-P, Valéro R, Gautier J-F, Larger E, et al. The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. *Diabetes*. 2008 Feb 1;57(2):503–8.

112. Boutin P, Chèvre JC, Hani EH, Gomis R, Pardini VC, Guillausseau PJ, et al. An automated fluorescent single-strand conformation polymorphism technique for screening mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene (maturity-onset diabetes of the young). *Diabetes*. 1997 Dec;46(12):2108–9.
113. Fokkema IFAC, Taschner PEM, Schaafsma GCP, Celli J, Laros JFJ, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat*. 2011 May;32(5):557–63.
114. Cao H, Shorey S, Robinson J, Metzger DL, Stewart L, Cummings E, et al. GCK and HNF1A mutations in Canadian families with maturity onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat*. 2002 Dec;20(6):478–9.
115. Mantovani V, Salardi S, Cerreta V, Bastia D, Cenci M, Ragni L, et al. Identification of eight novel glucokinase mutations in Italian children with maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat*. 2003 Oct;22(4):338.
116. Sagen J V, Odili S, Bjørkhaug L, Zelent D, Buettger C, Kwagh J, et al. From clinicogenetic studies of maturity-onset diabetes of the young to unraveling complex mechanisms of glucokinase regulation. *Diabetes*. 2006 Jun;55(6):1713–22.
117. Lorini R, Klersy C, D'Annunzio G, Massa O, Minuto N, Iafusco D, et al. Maturity-onset diabetes of the young in children with incidental hyperglycemia: a multicenter Italian study of 172 families. *Diabetes Care*. 2009 Oct;32(10):1864–6.
118. Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z, Kolouskova S, Pedersen O, Hansen T, et al. Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes*. 2010 Dec;11(8):529–35.
119. Gaspar G. Diagnóstico genético da diabetes tipo MODY na população portuguesa. *Inst Nac Saúde Doutor Ricardo Jorge*. 2013;2(5):30–2.
120. Gloyn AL, Odili S, Buettger C, Njolstad PR, Shiota C, Magnuson MA, et al. Glucokinase and the Regulation of Blood Sugar. In: *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*. Basel; 2004. p. 92–109. (Frontiers in Diabetes; vol. 16).
121. Arden C, Trainer A, de la Iglesia N, Scougall KT, Gloyn AL, Lange AJ, et al. Cell biology assessment of glucokinase mutations V62M and G72R in pancreatic beta-cells: evidence for cellular instability of catalytic activity. *Diabetes*. 2007 Jul 1;56(7):1773–82.
122. Ralph EC, Sun S. Biochemical characterization of MODY2 glucokinase variants V62M and G72R reveals reduced enzymatic activities relative to wild type. *Biochemistry*. American Chemical Society; 2009 Mar

- 24;48(11):2514–21.
123. Lopez AP, Foscaldi SA, Pérez MS, Krochik G, Rodríguez M, Traversa M, et al. Glucokinase gene mutation screening in Argentinean clinically characterized MODY patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009 Sep;117(8):391–4.
 124. Barrio R, Bellanné-Chantelot C, Moreno JC, Morel V, Calle H, Alonso M, et al. Nine novel mutations in maturity-onset diabetes of the young (MODY) candidate genes in 22 Spanish families. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2532–9.
 125. Capuano M, Garcia-Herrero CM, Tinto N, Carluccio C, Capobianco V, Coto I, et al. Glucokinase (GCK) mutations and their characterization in MODY2 children of southern Italy. *PLoS One*. 2012 Jan;7(6):e38906.
 126. Takeda J, Gidh-Jain M, Xu LZ, Froguel P, Velho G, Vaxillaire M, et al. Structure/function studies of human beta-cell glucokinase. Enzymatic properties of a sequence polymorphism, mutations associated with diabetes, and other site-directed mutants. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):15200–4.
 127. Vits L, Beckers D, Craen M, de Beaufort C, Vanfleteren E, Dahan K, et al. Identification of novel and recurrent glucokinase mutations in Belgian and Luxembourg maturity onset diabetes of the young patients. *Clin Genet*. 2006 Oct;70(4):355–9.
 128. Hwang JS, Shin CH, Yang SW, Jung SY, Huh N. Genetic and clinical characteristics of Korean maturity-onset diabetes of the young (MODY) patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006 Oct;74(1):75–81.
 129. Sagen J V, Bjørkhaug L, Molnes J, Raeder H, Grevle L, Søvik O, et al. Diagnostic screening of MODY2/GCK mutations in the Norwegian MODY Registry. *Pediatr Diabetes*. 2008 Oct;9(5):442–9.
 130. Yorifuji T, Fujimaru R, Hosokawa Y, Tamagawa N, Shiozaki M, Aizu K, et al. Comprehensive molecular analysis of Japanese patients with pediatric-onset MODY-type diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2012 Feb;13(1):26–32.
 131. Dominguez-Lopez M, Fernandez-Arias JD, Gonzalez-Molero In, Valdes S, Miguel G-ZJ, Guerrero M, et al. Clinical experience of a monogenic diabetes unit during 2008--2012 in the Department of Endocrinology and Nutrition (Malaga, Spain). *Endocr Abstr. BioScientifica*; 2013 Apr 1;32.
 132. Delvecchio M, Ludovico O, Bellacchio E, Stallone R, Palladino T, Mastroianno S, et al. MODY type 2 P59S GCK mutant: founder effect in South of Italy. *Clin Genet*. 2013 Jan;83(1):83–7.

133. Kawakita R, Hosokawa Y, Fujimaru R, Tamagawa N, Urakami T, Takasawa K, et al. Molecular and clinical characterization of glucokinase maturity-onset diabetes of the young (GCK-MODY) in Japanese patients. *Diabet Med*. 2014 Dec;31(11):1357–62.
134. Johansen A, Ek J, Mortensen HB, Pedersen O, Hansen T. Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug 2;90(8):4607–14.
135. Toaima D, Näge A, Wendenburg J, Praedicow K, Rohayem J, Engel K, et al. Identification of novel GCK and HNF1A/TCF1 mutations and polymorphisms in German families with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat*. 2005 May;25(5):503–4.
136. Galán M, Vincent O, Roncero I, Azriel S, Boix-Pallares P, Delgado-Alvarez E, et al. Effects of novel maturity-onset diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability. *Biochem J*. 2006 Jan 1;393(Pt 1):389–96.
137. Kavvoura FK, Raimondo A, Thanabalasingham G, Barrett A, Webster AL, Shears D, et al. Reclassification of diabetes etiology in a family with multiple diabetes phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jun 27;99(6):E1067–71.
138. Almeida C, Silva SR, Garcia E, Leite AL, Teles A, Campos RA. A novel genetic mutation in a Portuguese family with GCK-MODY. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2014 Jan 1;27(1–2):129–33.
139. Chakera AJ, Carleton VL, Ellard S, Wong J, Yue DK, Pinner J, et al. Antenatal Diagnosis of Fetal Genotype Determines if Maternal Hyperglycemia Due to a Glucokinase Mutation Requires Treatment. *Diabetes Care*. 2012 Jul 6;35(9):1832–4.
140. Xu JY, Chan V, Zhang WY, Wat NMS, Lam KSL. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Chinese MODY families: prevalence and functional analysis. *Diabetologia*. 2002 May;45(5):744–6.
141. Bjørkhaug L, Sagen J V, Thorsby P, Søvik O, Molven A, Njølstad PR. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene mutations and diabetes in Norway. *J Clin Endocrinol Metab*. Endocrine Society; 2003 Mar 2;88(2):920–31.
142. Ellard S, Bulman MP, Frayling TM, Allen LI, Dronsfield MJ, Tack CJ, et al. Allelic drop-out in exon 2 of the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene hinders the identification of mutations in three families with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):921–3.
143. Pearson ER, Boj SF, Steele AM, Barrett T, Stals K, Shield JP, et al. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with

- heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med.* 2007 Apr 4;4(4):e118.
144. Skupien J, Gorczynska-Kosiorz S, Klupa T, Cyganek K, Wanic K, Borowiec M, et al. Molecular background and clinical characteristics of HNF1A MODY in a Polish population. *Diabetes Metab.* 2008 Nov;34(5):524–8.
 145. Vaxillaire M, Abderrahmani A, Boutin P, Bailleul B, Froguel P, Yaniv M, et al. Anatomy of a Homeoprotein Revealed by the Analysis of Human MODY3 Mutations. *J Biol Chem.* 1999 Dec 10;274(50):35639–46.
 146. Harries LW, Hattersley AT, Ellard S. Messenger RNA Transcripts of the Hepatocyte Nuclear Factor-1 Gene Containing Premature Termination Codons Are Subject to Nonsense-Mediated Decay. *Diabetes.* 2004 Feb 1;53(2):500–4.
 147. Kaisaki PJ, Menzel S, Lindner T, Oda N, Rjasanowski I, Sahm J, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. *Diabetes.* 1997 Mar;46(3):528–35.
 148. Bellanne-Chantelot C, lafusco D, Blanche H, Bellanné-Chantelot C, Blanché H, Puca MR, et al. Screening for mutations in the glucokinase (MODY2/GCK) and Hepatocyte Nuclear Factor 1-alpha (MODY3/HNF1alpha) genes in South Italian families. *Diabetologia.* 1998;41(Suppl 1):A109–A109.
 149. Klupa T, Warram JH, Antonellis A, Pezzolesi M, Nam M, Malecki MT, et al. Determinants of the Development of Diabetes (Maturity-Onset Diabetes of the Young-3) in Carriers of HNF-1 Mutations: Evidence for parent-of-origin effect. *Diabetes Care.* 2002 Dec 1;25(12):2292–301.
 150. Losekoot M, Broekman AJ, Breuning MH, de Koning EJP, Romijn JA, Maassen JA. [Molecular diagnosis on indication of maturity onset diabetes of the young; results from 184 patients]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2005 Jan 15;149(3):139–43.
 151. Conget I, Giménez M, Nicolau J, Costa A, Oriola J, Casamitjana R. [Young adult onset diabetes mellitus. Clinical differences between MODY-3 and type 2 diabetes mellitus]. *Med Clin (Barc).* 2006 May 6;126(17):651–2.
 152. Stern E, Strihan C, Potievsky O, Nimri R, Shalitin S, Cohen O, et al. Four novel mutations, including the first gross deletion in TCF1, identified in HNF-4alpha, GCK and TCF1 in patients with MODY in Israel. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2007 Aug;20(8):909–21.
 153. Weintrob N, Stern E, Klipper-Aurbach Y, Phillip M, Gat-Yablonski G. Childhood obesity complicating the differential diagnosis of maturity-onset diabetes of the young and type 2 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2008

Feb;9(1):60–4.

154. Elbein SC, Teng K, Yount P, Scroggin E. Linkage and Molecular Scanning Analyses of MODY3/Hepatocyte Nuclear Factor-1 α Gene in Typical Familial Type 2 Diabetes: Evidence for Novel Mutations in Exons 8 and 10 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Jun;83(6):2059–65.
155. Lindner TH, Cockburn BN, Bell GI. Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia*. 1999 Jan 11;42(1):121–3.
156. Tanaka S, Kobayashi T, Tomura H, Okubo M, Nakanishi K, Takeda J, et al. A novel dominant-negative mutation of the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in Japanese early-onset type 2 diabetes. *Horm Metab Res*. 2000 Sep 19;32(9):373–7.
157. Reznik Y, Dao T, Coutant R, Chiche L, Jeannot E, Clauin S, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 α gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY)3 families. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Mar;89(3):1476–80.
158. Porter JR, Rangasami JJ, Ellard S, Gloyn AL, Shields BM, Edwards J, et al. Asian MODY: are we missing an important diagnosis? *Diabet Med*. 2006 Nov;23(11):1257–60.
159. Yamagata K, Yang Q, Yamamoto K, Iwahashi H, Miyagawa J, Okita K, et al. Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 α is dominant negative. *Diabetes*. 1998 Aug 1;47(8):1231–5.
160. Doria A, Yang Y, Malecki M, Scotti S, Dreyfus J, O’Keeffe C, et al. Phenotypic characteristics of early-onset autosomal-dominant type 2 diabetes unlinked to known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes. *Diabetes Care*. 1999 Feb;22(2):253–61.
161. Giuffrida FMA, Moises RS, Weinert LS, Calliari LE, Manna T Della, Dotto RP, et al. Maturity-onset diabetes of the young (MODY) in Brazil: Establishment of a national registry and appraisal of available genetic and clinical data. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017 Jan;123:134–42.
162. Owen KR. Monogenic diabetes: old and new approaches to diagnosis. *Clin Med*. 2013 Jun 1;13(3):278–81.
163. Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(5):1185–90.
164. Yeo G, Burge CB. Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals. *J Comput Biol*. 2004;11(2–3):377–94.

165. Saker PJ, Hattersley AT, Barrow B, Hammersley MS, McLellan JA, Lo YM, et al. High prevalence of a missense mutation of the glucokinase gene in gestational diabetic patients due to a founder-effect in a local population. *Diabetologia*. 1996 Dec;39(11):1325–8.
166. Harries LW, Ellard S, Stride A, Morgan NG, Hattersley AT. Isoforms of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Hum Mol Genet*. 2006 Jul 15;15(14):2216–24.