LÍLIAN ARAÚJO CAETANO

**Análise molecular por painel de sequenciamento em
larga escala em pacientes com diagnóstico clínico
de MODY (*maturity-onset diabetes of the young*)**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Ciências**

Programa de Endocrinologia

**Orientadora: Profa. 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

Caetano, Lillian Araújo

Análise molecular por painel de sequenciamento
em larga escala em pacientes com diagnóstico clínico
de MODY (maturity-onset diabetes of the young) /
Lillian Araújo Caetano. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Milena Gurgel Teles Bezerra.

Coorientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Diabetes
monogênico 3.MODY 4.Diagnóstico genético molecular
5.Sequenciamento em larga escala

USF/FM/DBD-409/17

Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia Genética (Laboratório de Investigação Médica, LIM/25), Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Sua realização teve colaboração da Unidade de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu marido Edward, a pessoa que mais contribuiu para a realização e finalização da mesma, ofertando todo o suporte emocional e motivacional necessários.

E à nossa querida filha Larissa, presente nesta fase final do doutorado, trazendo ainda mais alegria para as nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à minha orientadora Milena, pelo empenho e estímulo constantes. Ela representa um exemplo de dedicação, otimismo e motivação e contribuiu muito para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço ao meu coorientador Alex, pelo suporte e ensinamentos contínuos de genética e de vida.

Ao meu parceiro no laboratório e na pesquisa: Lucas, que tanto contribuiu em todas as fases do meu doutorado, desde os ensinamentos sobre genética à convivência e amizade.

Às minhas parceiras no nosso grupo de pesquisa: Aline e Ana Elisa, pelo apoio, amizade e carinho.

Agradeço às professoras titulares, Profa. Dra. Berenice e Profa. Dra. Ana Cláudia, pelo importante apoio ao nosso trabalho.

A todos os funcionários do LIM25 que colaboraram com este projeto: Graça, Eliete, Geni, Elisângela, Rafael.

Finalmente, sou muito grata à minha família. Ao meu esposo Edward, pelo grande amor, apoio incondicional, estímulo constante, amizade, companheirismo, e, em especial, pela participação fundamental nesta fase final do meu doutorado. À nossa querida filha Larissa, que está quase chegando e que já é tão amada. À minha mãe, Fátima, que sempre foi uma fonte de estímulo e perseverança: muito obrigada pelo amor, dedicação, apoio e pela confiança em meu trabalho. Ao meu pai Sebastião, pelo amor e afeto. Ao meu irmão Eduardo e cunhada Júlia, pelo carinho e atenção. A todos os outros familiares e amigos, sempre presentes em minha vida.

E obrigada a todos os pacientes e seus familiares que participaram deste projeto, por sua gentileza e colaboração.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da sua publicação:

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de símbolos	
Lista de quadros	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Diabetes Mellitus	2
1.2- Diabetes Mellitus Tipo Monogênico	2
1.3- MODY (<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>)	3
1.3.1- Subtipos mais prevalentes de MODY	6
A) MODY-HNF1A (MODY 3)	6
B) MODY-GCK (MODY 2)	7
C) MODY-HNF4A (MODY 1)	8
D) MODY-HNF1B (MODY 5)	8
1.3.2- Subtipos raros de MODY	9
1.3.3- MODY X	10
1.3.4- MODY no Brasil.....	10
1.3.5- Diagnóstico Genético de MODY	11
2- OBJETIVOS.....	15
2.1- Objetivos Primários	16
2.2- Objetivo Secundário	16
3- PACIENTES E MÉTODOS	17
3.1- Considerações Éticas	18
3.2- Local da Pesquisa	18
3.3- Critérios de Seleção	19
3.4- Casuística.....	20
3.4.1- Características fenotípicas para seleção do gene sequenciado previamente por Sanger	21
3.4.2- Origem da Casuística	21
3.4.3- Casuística selecionada para o estudo por painel de SLE	22
3.5- Estudo Genético-Molecular	23
3.5.1- Estratégia do Estudo	23
3.5.2- Extração do DNA Genômico.....	24
3.5.3- Sequenciamento em Larga Escala (SLE)	24

3.5.3.1- Painel Gênico Customizado	24
3.5.3.2- Análise direcionada dos dados gerados por SLE	26
3.5.3.3- Sondas para captura por SLE	26
3.5.3.4- Plataforma de SLE	27
3.5.3.5- Etapas do SLE	27
3.5.3.6- Análise de Bioinformática	29
3.5.3.7- Análise e priorização das variantes anotadas.....	32
3.5.3.8- Frequência estimada de MODY	32
3.5.3.9- Visualização das variantes selecionadas	33
3.5.3.10- Análise da Patogenicidade das variantes alélicas candidatas	34
3.5.3.11- Fluxograma de análise das variantes	36
3.5.4- Sequenciamento Automático Tradicional (Sanger)	38
3.5.5- Fluxograma do estudo.....	39
4- RESULTADOS	41
4.1- Características clínico-laboratoriais da casuística analisada.....	42
4.2- Sequenciamento em Larga Escala (SLE)	43
4.2.1- Validação do método e do painel de SLE	43
4.2.2- Métricas de qualidade do painel de SLE	44
4.2.3- Variantes alélicas detectadas pelo painel de SLE	44
4.2.4- Variantes alélicas patogênicas e provavelmente patogênicas detectadas por SLE	49
4.2.4.1- Mutações no gene GCK.....	52
4.2.4.2- Mutação no gene HNF1A.....	53
4.2.4.3- Mutação no gene HNF4A.....	53
4.2.4.4- Mutação no gene HNF1B.....	53
4.2.4.5- Mutações nos genes do canal de potássio: ABCC8 e KCNJ11	54
4.2.4.6- Mutação no gene PDX1	55
4.2.4.7- Mutações no gene PAX4.....	55
4.2.4.8- Mutação no gene NEUROD1	56
4.2.4.9- Mutação no gene NEUROG3.....	56
4.3- Características clínico-laboratoriais dos pacientes com diagnóstico genético confirmado de MODY	57
5- DISCUSSÃO.....	60
6- CONCLUSÕES.....	69
7- ANEXOS.....	72
8- REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE	93

LISTAS

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>ABCC8</i>	Gene <i>ATP-Binding Cassette subfamily C member 8</i>
<i>ABraOM</i>	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
<i>APPL1</i>	Gene <i>Adaptor Protein phosphotyrosine interaction, PH domain and Leucine zipper containing 1</i>
<i>BLK</i>	Gene <i>B-Lymphocyte specific tyrosine Kinase</i>
<i>CEL</i>	Gene <i>Carboxyl Ester Lipase</i>
<i>CNV</i>	Variação no número de cópias
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ESP-6500</i>	<i>Exome Sequencing Project – 6500 exomes</i>
<i>ExAC</i>	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
<i>GAD</i>	Anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico
<i>GCK</i>	Gene <i>Glucokinase</i>
<i>GRCh37/hg19</i>	<i>Genome Reference Consortium 37 / human genome 19</i>
<i>GnomAD</i>	<i>Genome Aggregation Database</i>
<i>HbA1c</i>	Hemoglobina glicada
<i>HNF1A</i>	Gene <i>Hepatocyte Nuclear Factor 1 homeobox Alpha</i>
<i>HNF1B</i>	Gene <i>Hepatocyte Nuclear Factor 1 homeobox Beta</i>
<i>HNF4A</i>	Gene <i>Hepatocyte Nuclear Factor 4 homeobox Alpha</i>
<i>IAA</i>	Anticorpo anti-insulina (<i>insulin autoantibody</i>)
<i>IA2</i>	Anticorpo anti-tirosina fosfatase (<i>islet antigen 2</i>)
<i>INS</i>	Gene <i>Insulin</i>
<i>KCNJ11</i>	Gene <i>Potassium Channel Inwardly rectifying subfamily J member 11</i>

<i>KLF11</i>	Gene <i>Kruppel-Like Factor 11</i>
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the Young</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>NEUROD1</i>	Gene <i>Neuronal Differentiation 1</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
<i>PAX4</i>	Gene <i>Paired box 4</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PDX1</i>	Gene <i>Pancreatic and Duodenal homeobox 1</i>
SLE	Sequenciamento em Larga Escala
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
<i>Targeted</i> -NGS	Sequenciamento alvo específico
UCSC	<i>University of California Santa Cruz genome browser</i>
WT	<i>Wild type</i> (alelo selvagem)

Lista de Símbolos

Kb	Quilobase
>	Maior
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
<	Menor
≤	Menor ou igual
mg/dL	Miligrama por decilitro
Mb	Megabase
ng/mL	Nanograma por mililitro

Lista de Quadros

Quadro 1 - Genes associados aos subtipos de MODY, frequência estimada e principais características fenotípicas	5
---	---

Lista de Figuras

Figura 1 – Casuística do estudo molecular por painel de SLE: pacientes com diagnóstico clínico de MODY e análise genética prévia negativa ...	23
Figura 2 – Etapas do SLE.....	29
Figura 3 – Exemplos de visualização de uma variante no programa IGV (<i>Integrative Genomics Viewer</i>).	33
Figura 4 – Fluxograma de filtragem utilizado na interpretação das variantes identificadas no painel de SLE deste estudo.....	37
Figura 5 – Fluxograma da estratégia do estudo genético-molecular de MODY utilizando sequenciamento em larga escala (SLE).....	40
Figura 6 – Variantes patogênicas e provavelmente patogênicas detectadas por SLE	49
Figura 7 – Heredogramas das famílias do estudo em que a mutação do probando foi identificada por SLE	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características clínico-laboratoriais dos pacientes com suspeita de MODY	42
Tabela 2 – Métricas do painel de SLE do estudo.....	44
Tabela 3 – Total de variantes alélicas identificadas pelo painel de SLE, número de variantes por paciente e número final de variantes selecionadas como potencialmente deletérias.....	45
Tabela 4 – Variantes alélicas candidatas identificadas por SLE nos pacientes analisados com suspeita clínica de MODY e classificadas de acordo com os critérios de patogenicidade da ACMG	46
Tabela 5 – Dados clínico-laboratoriais dos casos com diagnóstico genético confirmado de MODY por SLE	58

RESUMO

Caetano LA. *Análise molecular por painel de sequenciamento em larga escala em pacientes com diagnóstico clínico de MODY (maturity-onset diabetes of the young)* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O diabetes mellitus tipo MODY (*maturity-onset diabetes of the young*) é caracterizado por defeito na secreção de insulina, herança autossômica dominante, hiperglicemia de início precoce e anticorpos anti-células beta negativos. Até o momento, já foram descritas mutações em 14 genes diferentes. A confirmação do diagnóstico de MODY é feita por estudo genético-molecular, tradicionalmente pelo método de Sanger. Diante da grande heterogeneidade genética de MODY, acrescida da dificuldade de estudo de alguns genes por seu grande tamanho e ausência de *hotspots*, o sequenciamento em larga escala (SLE) mostra-se promissor para uma análise genética custo-efetiva na suspeita de MODY. No Brasil, existem poucos estudos genéticos de rastreamento de MODY e uma alta prevalência de casos sem mutações identificadas nos genes testados (MODY X). Os objetivos deste estudo foram: 1) analisar simultaneamente todos os genes associados a MODY em uma coorte de pacientes com suspeita clínica, utilizando um painel de SLE; 2) avaliar a patogenicidade das variantes alélicas identificadas de acordo com os critérios da Sociedade Americana de Genética Médica (ACMG). Foram selecionados 80 casos com fenótipo de MODY e análise prévia negativa dos 2 genes mais prevalentes, *GCK* e *HNF1A*, pelo método de sequenciamento de Sanger. Estes casos foram analisados pelo método de SLE, direcionado para regiões gênicas alvo, por meio de um painel customizado, com sequenciamento simultâneo de 51 genes nucleares e do genoma mitocondrial. As mutações identificadas foram correlacionadas com o fenótipo e foi realizada a segregação familiar. Uma cobertura de no mínimo 20x foi obtida em 98% das regiões alvo. Dos 80 pacientes avaliados, foram detectadas variantes patogênicas/potencialmente patogênicas em 16 casos (20%), confirmando o diagnóstico genético de MODY. Em 15 dos 80 pacientes foram identificadas 16 variantes de significado incerto, restando ainda 42 casos com diagnóstico molecular não esclarecido. Dos 16 casos confirmados geneticamente: 6 foram no gene *GCK*, 1 no *HNF1A*, 1 no *HNF4A*, 1 no *HNF1B*, 6 em genes raros associados a MODY (1 no *ABCC8*, 1 no *KCNJ11*, 1 no *PDX1*, 2 no *PAX4*, 1 no *NEUROD1*), e 1 no *NEUROG3*, gene associado a diabetes neonatal. Dentre estas 16 variantes, 2 não haviam sido descritas previamente. As 6 mutações no *GCK* não tinham sido detectadas na análise prévia por: a) 4 casos falso negativos no sequenciamento por Sanger (3 devido ao fenômeno genético de *allelic dropout* e 1 por erro na leitura do eletroferograma); b) 2

erros na hipótese clínica inicial do subtipo de MODY (baseada no padrão glicêmico e na resposta terapêutica dos pacientes), levando ao sequenciamento prévio de outro gene. A variante no *HNF1A* não foi detectada previamente por erro na leitura do eletroferograma (caso falso negativo no Sanger). Uma variante foi identificada no gene *HNF4A*, que não tinha sido sequenciado anteriormente e apresenta fenótipo semelhante ao do *HNF1A*. O paciente com variante no *HNF1B* não apresentava relato prévio de cistos renais ou malformações genito-urinárias e por isso não tinha sido considerada a hipótese clínica de MODY5. Além disso, o SLE confirmou o diagnóstico genético de 6 pacientes com variantes em genes de MODY considerados raros, que habitualmente não são sequenciados na rotina de Sanger e ainda detectou uma variante em um gene de diabetes neonatal (sendo necessário maiores estudos para estabelecer uma relação causal com MODY). Em 13 dos 16 casos índices diagnosticados, os familiares encontravam-se disponíveis para exame genético e a co-segregação foi concordante em 8 famílias. Todos os probandos avaliados apresentavam características clínico-laboratoriais típicas de MODY. Os achados deste estudo mostraram que o SLE foi capaz de aumentar a acurácia no diagnóstico de MODY, permitindo a confirmação molecular de 20% dos casos antes negativos e reduzindo, assim, o número de casos MODY X no Brasil. A abordagem genética por painel de SLE para diagnosticar casos com suspeita clínica de MODY mostrou-se promissora para elucidar as bases genéticas desse tipo de diabetes monogênico.

Descritores: Diabetes mellitus; diabetes monogênico; MODY; diagnóstico genético molecular; sequenciamento em larga escala.

ABSTRACT

Caetano LA. *Molecular analysis by large-scale sequencing panel in patients with clinical diagnosis of MODY (maturity-onset diabetes of the young)* [Thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Diabetes mellitus type MODY (maturity-onset diabetes of the young) is characterized by defects in insulin secretion, autosomal dominant inheritance, early onset of hyperglycemia, and negative anti-beta cell antibodies. To date, mutations in 14 genes are associated with MODY. The definitive diagnosis relies on genetic tests, traditionally by Sanger sequencing. However, given the genetic heterogeneity of this condition, added to the difficulty of studying some genes due to their large size and lack of hotspots, large-scale sequencing (LSS) seems promising for cost-effective genetic analysis on suspicion of MODY. In Brazil, there are few cohorts screened for MODY and a high prevalence of MODY X (unclear genetic diagnosis). This study aimed to analyze simultaneously all MODY genes in a cohort of clinically suspected patients using a LSS panel; and to evaluate the pathogenicity of identified allelic variants according to the criteria of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). We selected 80 subjects with MODY phenotype and negative previous analysis of the 2 most prevalent genes, *GCK* and *HNF1A*, by Sanger sequencing method. These cases were analyzed by LSS method, with simultaneous sequencing of target genes. We designed a customized panel, including 51 nuclear genes and the mitochondrial genome. The identified mutations were correlated to the phenotype and family segregation was evaluated. At least 20x coverage was obtained in 98% of the targeted regions. Of 80 evaluated subjects, pathogenic/probably pathogenic variants were detected in 16 cases (20%), confirming the genetic diagnosis of MODY. In 15 of 80 patients, 16 variants of uncertain significance were identified, remaining 42 cases with unexplained molecular diagnosis. Of the 16 genetically confirmed cases: 6 were in the *GCK* gene, 1 in *HNF1A*, 1 in *HNF4A*, 1 in *HNF1B*, and 6 in rare genes associated with MODY (1 in *ABCC8*, 1 in *KCNJ11*, 1 in *PDX1*, 2 in *PAX4* and 1 in *NEUROD1*), and 1 in *NEUROG3*, a gene associated with neonatal diabetes. Of these 16 variants, 2 had not been previously described. Those 6 variants in *GCK* were not detected in the prior analysis because of: a) 4 false negative cases in Sanger sequencing (allelic dropout had occurred in 3 cases and one variant was overlooked, due to electropherogram interpretation failure); b) 2 errors in the initial clinical hypothesis of the MODY subtype (based on the glycemic pattern and therapeutic response), leading to the prior sequencing of another gene. The variant in *HNF1A* was not previously identified due to misinterpretation in electropherogram (Sanger false negative case).

One variant were detected in the *HNF4A* gene, not formerly sequenced, and had a similar phenotype to that of *HNF1A*. The patient with *HNF1B* variant did not have a previous report of renal cysts or genito-urinary malformations and therefore the clinical hypothesis of MODY5 was not considered. In addition, LSS confirmed the genetic diagnosis of 6 patients harboring variants in MODY genes considered to be rare, which are not usually sequenced in the Sanger routine, and also detected one variant in a neonatal diabetes gene (further studies are necessary to establish a causal relationship with MODY). Relatives were available for genetic testing in 13 of these 16 index cases diagnosed and co-segregation was concordant in 8 families. All probands evaluated showed typical clinical and laboratory characteristics of MODY. These study findings showed that targeted-LSS could increase accuracy in MODY diagnosis, enabling molecular confirmation of 20% of previous negative cases and thus reducing the number of MODY X cases in Brazil. The genetic approach of LSS panel to diagnose cases with clinical suspicion of MODY has shown promise for elucidating the genetic basis of this type of monogenic diabetes.

Descriptors: Diabetes mellitus; monogenic diabetes; MODY; molecular genetic diagnosis; large-scale sequencing.

1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1- Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) corresponde a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou na ação deste hormônio (1). Conforme preconizado pela *American Diabetes Association* (1), é classificado em DM tipo 1 (5-10% dos casos no adulto), DM tipo 2 (cerca de 90-95% dos casos), diabetes gestacional (1-38% das gestações) (2, 3) e outros tipos específicos de diabetes, como diabetes monogênico, diabetes secundário a endocrinopatias, secundário a doenças do pâncreas exócrino e induzido por drogas (1).

1.2- Diabetes Mellitus Tipo Monogênico

O diabetes mellitus monogênico inclui um grupo heterogêneo de tipos de diabetes causados por mutações em um único gene, podendo ocorrer por defeitos na função da célula beta pancreática, por alterações no receptor de insulina (síndromes de resistência insulínica) ou em associação com outras síndromes genéticas, como a síndrome de Wolfram (4).

O diabetes mellitus resultante de disfunção genética da célula beta pode ser subdividido em *Maturity-Onset Diabetes of the Young* (MODY), diabetes neonatal e diabetes mitocondrial (4), sendo MODY o tipo mais frequente, que corresponde a 1 a 2% de todos os casos de DM (5, 6) e até 4% dos casos da população pediátrica (7).

1.3- MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*)

O diabetes mellitus monogênico do jovem, mais conhecido como MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) compreende diferentes formas clínicas de diabetes, que têm em comum um defeito genético primário na secreção de insulina, sendo cada subtipo associado a um gene distinto (5). Foi descrito pela primeira vez em 1960 (8) e o acrônimo MODY vem sendo utilizado desde 1975 (9). Até 2005 era classificado em 6 subtipos (10) e atualmente já foram descritas mutações em 14 genes diferentes, sendo que os subtipos 12, 13 e 14 foram identificados recentemente (11-13), o que evidencia a grande heterogeneidade genética desta doença e a descoberta contínua de novos genes.

Apesar de ser um tipo raro de diabetes, a frequência de casos de MODY atinge um valor significativo, por se tratar de um subtipo de uma doença altamente prevalente no Brasil e no mundo (14). Em 2015, a *International Diabetes Federation* (IDF) publicou dados atualizados, destacando que há mais de 400 milhões de portadores de DM no mundo e que o Brasil ocupa a 4ª posição entre os países com maior prevalência de DM, com cerca de 14 milhões de diabéticos (15). Como MODY corresponde a 1-2% de todos os casos de DM, estima-se que teríamos de 140.000 a 280.000 indivíduos com MODY no Brasil. Porém, este número é subestimado na prática clínica, visto que casos de MODY são frequentemente confundidos com diabetes tipo 1 ou 2 (16, 17). Estima-se que aproximadamente 5% dos indivíduos classificados como tendo DM tipo 2 e cerca de 10% daqueles considerados DM tipo 1 são na verdade portadores de MODY (18).

A característica marcante de MODY é a deficiência na secreção de insulina (1, 19), associada a uma grande heterogeneidade clínica e genética (5, 11-13) (Quadro 1). É caracterizado por herança autossômica dominante, hiperglicemia de início precoce (tipicamente antes dos 25 anos) (5, 19, 20) e anticorpos anti-células beta negativos (21). MODY é uma doença monogênica de alta penetrância e esta varia de 80 a 95% (19).

Quadro 1: Genes associados aos subtipos de MODY, frequência estimada e principais características fenotípicas

Tipo	Gene	Localização Cromossômica	Número de Éxons	Tamanho		Frequência	Características Fenotípicas ^{I,J,K}
				Gene	cDNA		
MODY 1	<i>HNF4A</i>	20q13.12	13	76 kb	3,2 kb	2 - 10% ^{A,B}	Macrossomia; hipoglicemia neonatal. Hiperglicemia progressiva; início: adolescência/adulto jovem. HDL baixo. Sensibilidade a sulfoniluréias.
MODY 2	<i>GCK</i>	7p15.3-p15.1	12	54 kb	2,7 kb	20 - 63% ^{A,B,C}	Hiperglicemia leve assintomática e estável. Início: desde nascimento / infância. Pequeno incremento no exame de curva glicêmica.
MODY 3	<i>HNF1A</i>	12q24.31	10	26 kb	4,0 kb	21 - 72% ^{A,B,C,D}	Hiperglicemia progressiva; início: adolescência/adulto jovem. Baixo limiar renal de reabsorção de glicose. Grande incremento no exame de curva glicêmica. Baixos níveis de proteína C reativa; HDL alto. Sensibilidade a sulfoniluréias.
MODY 4	<i>PDX1</i>	13q12.1	2	6 kb	2,5 kb	< 1% ^B	Diabetes e agenesia parcial do pâncreas ^L
MODY 5	<i>HNF1B</i>	17q12	9	59 kb	3,0 kb	1 - 6% ^{A,B}	Hiperglicemia progressiva. Disfunção renal; cistos renais. Malformações urogenitais. Disfunção pancreática exócrina subclínica. Exames hepáticos alterados; hiperuricemia.
MODY 6	<i>NEUROD1</i>	2q32	2	8 kb	2,9 kb	< 1% ^{A,B}	Poucos casos descritos
MODY 7	<i>KLF11</i>	2p25.1	4	12 kb	4,0 kb	Raro ^E	Poucos casos descritos
MODY 8	<i>CEL</i>	9q34.3	11	10 kb	2,4 kb	Raro ^E	Poucos casos descritos
MODY 9	<i>PAX4</i>	7q32.1	9	6 kb	2,0 kb	Raro ^E	Poucos casos descritos
MODY 10	<i>INS</i>	11p15.5	3	2 kb	0,6 kb	Raro ^A	Poucos casos descritos
MODY 11	<i>BLK</i>	8p23-p22	13	71 kb	2,6 kb	Raro ^E	Poucos casos descritos
MODY 12	<i>ABCC8</i>	11p15.1	39	84 kb	4,9 kb	Raro ^F	Sensibilidade a sulfoniluréias
MODY 13	<i>KCNJ11</i>	11p15.1	1	4 kb	2,8 kb	Raro ^G	Sensibilidade a sulfoniluréias
MODY 14	<i>APPL1</i>	3p14.3	22	46 kb	6,1 kb	Raro ^H	Poucos casos descritos

Adaptado de [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\) http://www.omim.org/entry/606391](http://www.omim.org/entry/606391), [Ensembl http://www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), [GeneCards http://www.genecards.org](http://www.genecards.org).

^A Shields BM, et al. (17), ^B Frayling TM, et al. (22), ^C Chèvre JC, et al. (23), ^D Shepherd M, et al. (24), ^E Fajans SS, et al. (5), ^F Bowman P, et al. (11), ^G Bonnefond A, et al. (12), ^H Prudente S, et al. (13), ^I Hattersley A, et al. (25), ^J Naylor R, et al. (16), ^K Althari S, et al. (26), ^L Caetano LA, et al. (27)

1.3.1- Subtipos mais prevalentes de MODY

A prevalência dos diversos tipos de MODY varia em diferentes países. O MODY-GCK (MODY 2) e o MODY-*HNF1A* (MODY 3) são os mais frequentes em todas as populações estudadas, chegando a 84% dos casos em uma grande casuística de 1.177 pacientes com diagnóstico de MODY confirmado por exame genético no Reino Unido (17). As diferenças na prevalência estão provavelmente associadas às várias formas de investigação (avaliação em população pediátrica ou adulta, diabetes auto-referido, diagnóstico de hiperglicemia por rastreamento familiar; recrutamento em ambulatorios) (20).

A) MODY-*HNF1A* (MODY 3)

O subtipo de MODY mais frequente nas maiores coortes estudadas é o MODY 3 (17, 22, 28). É causado por variantes no gene *HNF1A*, localizado no cromossomo 12q, que codifica um fator de transcrição crucial na diferenciação e funcionamento da célula β , regulando a expressão do gene da insulina e, também, de outros genes que codificam proteínas envolvidas no transporte e metabolismo da glicose (19). Existem mais de 400 variantes diferentes já descritas no *HNF1A* (29), que possui um *hotspot* mutacional (região gênica com maior concentração de mutações) no éxon 4 (P291fsinsC) (30), o que corresponde a aproximadamente 10 a 15% das variantes nesse gene (31). Clinicamente, o MODY-*HNF1A* é caracterizado por níveis variados de hiperglicemia, de caráter progressivo, com início na adolescência ou no adulto jovem, em indivíduos habitualmente magros (32). No exame de curva

glicêmica, verifica-se um incremento (entre a glicemia de jejum e a de 2 horas após sobrecarga com 75g de glicose) maior que 80 – 90 mg/dL (32, 33). Um achado laboratorial típico é a diminuição do limiar renal de reabsorção de glicose, isto é, presença de glicosúria com glicemias abaixo de 130 mg/dL (34). Outras características laboratoriais marcantes incluem baixa concentração plasmática de proteína C reativa (35) e níveis elevados de HDL (apesar de não conferirem proteção cardiovascular, já que existe um risco aumentado de doença arterial coronariana em pacientes com MODY-HNF1A) (32). No seguimento, são frequentes as complicações crônicas do diabetes, assim como no DM tipo 1 e tipo 2 (32). Uma particularidade do tratamento do MODY 3 é a maior sensibilidade às sulfoniluréias, apresentando bom controle glicêmico com doses baixas desse medicamento e que persiste durante muitos anos (31, 36).

B) MODY-GCK (MODY 2)

O MODY 2 está associado a mutações no gene da glicoquinase (*GCK*) e é o subtipo de MODY mais frequente na França, Itália, Espanha, Alemanha e Áustria (23, 37-39). Já foram identificadas mais de 600 mutações diferentes distribuídas nos 10 éxons codificadores do gene *GCK*, que não apresenta uma região *hotspot* (40). Variantes no *GCK*, localizado no cromossomo 7, levam a uma redução na fosforilação da glicose e resultam em um defeito na sensibilidade das células beta ao nível glicêmico e subsequente desregulação da secreção de insulina (19). O fenótipo do MODY-GCK é marcado por hiperglicemia leve, geralmente assintomática e estável (32). O diagnóstico comumente é incidental, na infância/juventude ou durante a gravidez (41). Tipicamente a glicemia de jejum varia de 100 a 144 mg/dL, a hemoglobina

glicada é menor que 7,5% (32) e no exame de curva glicêmica, nota-se um incremento abaixo de 60mg/dL entre a glicemia de jejum e a de 2 horas após sobrecarga (33). As complicações crônicas relacionadas ao diabetes são raras (42, 43) e, habitualmente, não requer nenhum tratamento específico (nem antidiabéticos orais nem insulinoterapia) (44), exceto na gravidez (em que pode ser necessário o uso de insulina, de acordo com o crescimento fetal) (32).

C) MODY-*HNF4A* (MODY 1)

O MODY 1 é causado por mutações em heterozigose no gene do fator de transcrição *HNF4A*, que possui 13 éxons e localiza-se no cromossomo 20. Existem mais de 100 variantes já descritas nesse gene (29). O MODY-*HNF4A* apresenta características clínicas muito semelhantes às do MODY-*HNF1A* (MODY 3), como hiperglicemia progressiva e sensibilidade às sulfoniluréias. No entanto, o MODY 1 difere quanto ao perfil lipídico (níveis de HDL colesterol reduzidos) (32) e quanto à ausência de redução no limiar renal de reabsorção de glicose (25). Outras características marcantes do MODY-*HNF4A* são a macrossomia fetal e a hipoglicemia neonatal transitória, que pode preceder o quadro de diabetes (32).

D) MODY-*HNF1B* (MODY 5)

O MODY 5 é causado por mutações no gene do fator de transcrição *HNF1B*, que contém 9 éxons e está localizado no cromossomo 17 (19). Tais mutações podem ocorrer esporadicamente como variantes *de novo* (até 50% dos casos) (45) ou podem ser transmitidas de modo hereditário, por um padrão

autossômico dominante (46). O MODY-*HNF1B* é um tipo peculiar de diabetes monogênico, associado a alterações renais que podem surgir antes do aparecimento do diabetes ou desde o nascimento, como disfunção renal progressiva (sem a presença de retinopatia diabética), múltiplos cistos renais, hipoplasia renal, dilatação pielocalicial não-obstrutiva, doença glomerulocística. Adicionalmente, os pacientes podem apresentar anomalias do trato genital, alterações de enzimas hepáticas e atrofia pancreática com deficiência exócrina subclínica (46-48). A maioria dos pacientes requer insulinoterapia (47).

1.3.2- Subtipos raros de MODY

Os demais subtipos de MODY (*PDX1*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *APPL1*) são considerados raros, já que mutações nos respectivos genes foram observadas em poucas famílias (10-13, 27, 49-54). Porém, sua real prevalência pode estar subestimada já que esses genes não são habitualmente pesquisados em exames genéticos de rotina.

Tais genes participam da regulação de funções diversas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento da célula beta, assim como possuem papel na secreção de insulina (7, 55, 56), como:

- participação no desenvolvimento pancreático: *PDX1* e *PAX4*;
- regulação da expressão do gene da insulina: *NEUROD1* e *KLF11*;
- expressão seletiva e disfunção das células beta: *INS* e *BLK*;
- codificação das subunidades dos canais de potássio da célula beta: *ABCC8* e *KCNJ11*;

- codificação de uma enzima lipolítica que representa um dos principais componentes do suco pancreático exócrino, além de provável atuação na secreção endógena de insulina: *CEL*;

- participação na via de sinalização da insulina: *APPL1*.

Diante do baixo número de casos descritos, torna-se difícil estabelecer um padrão fenotípico que caracterize bem a variabilidade em cada subtipo (57).

1.3.3- MODY X

Considera-se MODY X quando há um quadro clínico sugestivo de MODY, porém sem mutações identificadas nos genes conhecidos. A prevalência de MODY X na literatura mundial varia em média de 15 a 20%, podendo atingir até 65% dos casos encaminhados com suspeita clínica de MODY (17, 19, 22, 23, 58, 59). Tais casos são uma fonte importante para identificação de novas mutações e/ou novos genes relacionados a MODY (59). Entretanto, a maioria dos estudos foi realizada pela técnica de Sanger e analisou apenas uma parcela dos genes conhecidos associados a MODY, incluindo apenas a região codificadora e em geral direcionados pelo fenótipo.

1.3.4- MODY no Brasil

Estudos envolvendo a identificação e a prevalência dos subtipos de MODY na população brasileira são escassos. Entre os indivíduos com mutações identificadas, o tipo mais comum é o MODY-GCK (MODY 2), seguido pelo MODY-*HNF1A* (MODY 3) (60-69). Ressalta-se a alta prevalência de

MODY X no Brasil, que varia de 46,2 a 73,9% (60-62, 67). Esse achado pode estar relacionado a diferenças étnicas da nossa população, a diferenças no recrutamento (critérios clínicos usados, origem dos pacientes avaliados) e na investigação das famílias (metodologia utilizada) ou ainda, tratar-se de um viés diante do pequeno número de pacientes estudados (60).

Até o momento, não há nenhum estudo sobre SLE para diagnóstico de MODY no Brasil.

1.3.5- Diagnóstico Genético de MODY

O diagnóstico de MODY é baseado na suspeita clínica e confirmado por exame genético-molecular (42). A análise genética é fundamental, porque além de confirmar o diagnóstico, classifica o subtipo de MODY e tem relevante impacto clínico, predizendo o provável prognóstico e possibilitando a modificação do tratamento do paciente (direcionando para o manejo específico do subtipo de diabetes identificado) (42). E ainda é essencial para o aconselhamento genético, já que parentes de primeiro grau têm um risco de 50% de herdar a mutação. O rastreamento dessa condição genética é importante para o próprio paciente e também para os familiares, uma vez que permite o tratamento adequado dos parentes acometidos, além de possibilitar a indivíduos assintomáticos, mas portadores da mutação, um monitoramento glicêmico regular, resultando em diagnóstico precoce da hiperglicemia e decisão terapêutica apropriada (42).

O exame genético mais utilizado atualmente para diagnóstico molecular de MODY é o sequenciamento pelo método tradicional de Sanger (70), que permite a análise de um gene associado a determinado subtipo, sendo

direcionado pelo fenótipo do paciente. Diante das dificuldades de realização rotineira desse teste genético (por seu alto custo e baixa disponibilidade da técnica, restrita a poucos centros), a maioria dos pacientes com MODY não é diagnosticada ou os pacientes são diagnosticados incorretamente como DM tipo 1 ou 2, com base apenas em critérios clínicos (17).

O sequenciamento por Sanger, além de oneroso, é relativamente demorado, principalmente em doenças como MODY, diante: 1) da grande diversidade genética (14 genes diferentes descritos); 2) da dificuldade de estudo de alguns genes devido ao seu tamanho (como o gene *ABCC8*, que possui 39 éxons); e 3) da ausência de concentração de mutações em regiões específicas (*hotspots*) na maior parte dos genes dos diversos subtipos, sendo necessário o estudo de todos os éxons daquele gene (71). Assim, habitualmente o sequenciamento por Sanger na rotina acaba sendo direcionado para os 2 genes mais prevalentes de MODY (*GCK* e *HNF1A*), sendo a escolha do gene a ser estudado baseada nas características clínicas do paciente (71). Os genes raros associados a MODY não são usualmente incluídos na análise por Sanger, exceto em situações de pesquisa, em que as formas mais comuns foram negativas e a suspeita clínica de MODY é muito forte.

Diante das limitações da técnica de Sanger, desde 2004 vêm sendo implantadas novas plataformas de sequenciamento genético em larga escala (SLE) (72), em busca de uma abordagem molecular mais ampla do genoma. Desde então, avanços crescentes têm levado ao aperfeiçoamento dessas novas tecnologias, visando o sequenciamento de toda a região genômica de um determinado gene ou a genotipagem simultânea de diversos genes e até

mesmo o sequenciamento completo do genoma, com maior velocidade e menor custo (73, 74).

Ao realizar o sequenciamento simultâneo de vários genes, o SLE torna possível o diagnóstico mais rápido e menos laborioso de doenças mendelianas com grande heterogeneidade genética, como MODY (permitindo a pesquisa dos subtipos mais raros, que habitualmente não são estudados) (71). Diante da alta taxa de casos não confirmados (MODY X) no Brasil, o sequenciamento pela técnica de SLE surge como uma estratégia para expandir o diagnóstico molecular de MODY e tornar a análise genética custo-efetiva em casos suspeitos, além de possibilitar a identificação de novas variantes e de outros genes associados a esse fenótipo.

Nos últimos 5 anos foram publicados estudos que utilizaram plataformas de SLE para diagnóstico de MODY, desde abordagens com painel de genes alvo (*targeted sequencing*) (75-77) a sequenciamento completo do exoma (*whole-exome sequencing*) (12, 78, 79). Em um destes estudos, os pacientes já haviam sido testados previamente para os genes *GCK*, *HNF1A* e/ou *HNF4A* (com resultados negativos) e a pesquisa por painel de SLE permitiu aumentar a taxa de detecção de mutações em 15% (75). Em outro estudo foi realizado o sequenciamento exômico de 111 genes implicados no metabolismo da glicose, permitindo confirmar o diagnóstico genético de MODY em alguns casos em que o sequenciamento de Sanger tinha sido negativo para mutações nos genes *HNF1A*, *HNF4A*, *GCK*, *HNF1B* e *INS* (78). Em 2012, o uso do SLE por meio do exoma de pacientes com MODY X permitiu a associação do gene *KCNJ11* ao quadro de MODY (este gene já havia sido associado previamente a diabetes

neonatal, e a partir deste estudo foi caracterizado o décimo terceiro tipo de MODY) (12).

Um dos grandes desafios do SLE é determinar, diante das milhares de variantes alélicas identificadas no sequenciamento, qual é a variante patogênica causadora do fenótipo (71, 80). Para avaliação da patogenicidade de uma variante, é necessária uma investigação detalhada, considerando as características genéticas da variante, estudos de co-segregação e predições *in silico* (81). Recentemente, foram publicadas diretrizes propostas pela Sociedade Americana de Genética Médica (*American College of Medical Genetics and Genomics - ACMG and Association for Molecular Pathology - AMP*), a fim de estabelecer critérios rigorosos para interpretação dos achados genéticos (82).

Diante do crescente uso de técnicas de SLE para diagnóstico molecular, tal abordagem tem se mostrado promissora para investigação de casos de diabetes com suspeita de uma base monogênica, mas ainda não confirmada (83). Por se tratar de um processo mais rápido e de menor custo (78, 84), o SLE torna-se uma ferramenta atrativa para o diagnóstico de MODY (7).

Considerando que a confirmação genética de MODY implica em mudança terapêutica e melhor predição do prognóstico do paciente, e que a população brasileira com suspeita clínica desta condição é bastante heterogênea e nunca foi investigada anteriormente pela técnica de SLE, justifica-se a realização do presente estudo.

2- OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos Primários

2.1.1- Analisar simultaneamente todos os genes associados a MODY em uma coorte de pacientes com suspeita clínica desta condição, utilizando um painel customizado de genes alvos por meio de sequenciamento paralelo em larga escala (SLE).

2.1.2- Avaliar a patogenicidade das variantes alélicas identificadas de acordo com os critérios propostos pela Sociedade Americana de Genética Médica (*American College of Medical Genetics and Genomics*).

2.2- Objetivo Secundário

2.2.1- Correlacionar os achados moleculares às características clínicas dos pacientes avaliados.

3- PACIENTES E MÉTODOS

3- PACIENTES E MÉTODOS

3.1- Considerações Éticas

O presente estudo foi conduzido seguindo os princípios éticos e orientações contidos na declaração de Helsinki e os termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Este estudo foi incluído como subprojeto do protocolo de pesquisa “Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico”, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número #70637. Antes do início da pesquisa genética, foi obtido consentimento informado por escrito de todos os pacientes maiores de 18 anos ou de pais/tutores e também de todos os familiares que participaram do estudo.

A confidencialidade dos resultados obtidos foi garantida a todos os pacientes. Os achados de alterações genéticas relacionadas a MODY foram informados aos pacientes e/ou seus responsáveis legais. Foi realizado aconselhamento genético e mantido seguimento dos pacientes e familiares acometidos, conforme recomendado pela Sociedade Brasileira de Genética Clínica no projeto Diretrizes do Conselho Federal de Medicina.

3.2- Local da Pesquisa

Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia Genética (Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM25) e na Unidade de Diabetes, ambas pertencentes à Disciplina de Endocrinologia da FMUSP.

Sua realização teve colaboração do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LIM15) e do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da FMUSP.

3.3- Critérios de Seleção

Os critérios clínico-laboratoriais utilizados para seleção dos pacientes foram baseados naqueles propostos por Naylor et al.(16), Murphy et al. (32) e Shields et al (6).

Critérios de Inclusão:

- idade de início da hiperglicemia antes dos 35 anos em pelo menos um indivíduo da família;
- história familiar de diabetes em pelo menos 2 gerações consecutivas uniparentais;
- ausência de obesidade e/ou sem sinais de resistência insulínica;
- anticorpos anti-células beta 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, que pode durar até 3 a 5 anos).

Considerações relevantes sobre a seleção para o estudo:

É importante destacar que os pacientes selecionados não precisaram preencher todos os critérios acima para serem referidos para a pesquisa genética, visto que o uso de critérios clínicos menos rígidos para diagnóstico de MODY pode permitir um aumento do número de casos diagnosticados (85).

Assim sendo, algumas considerações foram feitas para situações específicas:

- Antecedentes familiares desconhecidos ou ausência de história familiar de diabetes não configuraram critério de exclusão, desde que o paciente tivesse outras características muito sugestivas de MODY.
- A presença de sobrepeso ou obesidade ao diagnóstico não excluiu MODY, apesar de serem pouco frequentes nessa população (86, 87).
- A presença de anticorpos anti-células beta em valores positivos, mas em baixos títulos, não excluiu o diagnóstico de MODY (uma vez que os anticorpos podem ser encontrados em até 1% dos casos de MODY, assim como na população controle, sem diabetes) (21).

Critérios mínimos de inclusão:

Com base no exposto, os critérios mínimos de inclusão utilizados foram:

- 1) idade de início do diabetes ou pré-diabetes antes dos 35 anos;
- 2) nos casos em que o principal diagnóstico diferencial fosse DM tipo 1, eram obrigatórios os seguintes critérios (21, 88):

- anticorpos anti-células beta negativos ou em baixos títulos;
- peptídeo C detectável após 3 anos do diagnóstico de DM.

3.4- Casuística

Foram selecionados para este estudo por painel de SLE pacientes com suspeita clínica de MODY e com análise genética prévia negativa, pelo método de Sanger, para um dos 2 genes mais prevalentes: *GCK* ou *HNF1A* (89).

3.4.1- Características fenotípicas para seleção do gene sequenciado previamente por Sanger

Os pacientes que preenchiam os critérios de suspeita clínica de MODY foram direcionados para a pesquisa por Sanger de mutações nos genes *GCK* ou *HNF1A* de acordo com o fenótipo (90):

- Grupo 1 – Pesquisa do gene *GCK*:

- Hiperglicemia leve, com evolução não progressiva.
- Ausência de tratamento do diabetes sem descompensação metabólica ou tendência a cetose.

- Grupo 2 – Pesquisa do gene *HNF1A*:

- Controle glicêmico adequado com baixas doses de sulfoniluréia.
- Pacientes com características sugestivas de MODY, mas que não preenchiam o quadro clínico-laboratorial típico de MODY-*GCK* foram pesquisados para o gene *HNF1A* por ser o mais prevalente associado a MODY.

3.4.2- Origem da Casuística

Os pacientes selecionados eram oriundos do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e também encaminhados por médicos colaboradores de várias regiões do Brasil. O recrutamento dos pacientes de serviços externos foi feito por meio de formulário eletrônico (anexo B), disponibilizado no *site* oficial do Grupo de Diabetes Monogênico da USP (91). Todos foram avaliados segundo os critérios de inclusão do estudo.

3.4.3- Casuística selecionada para o estudo por painel de SLE

Do total de 152 pacientes com suspeita clínica de MODY referidos para o estudo molecular, 15 pacientes foram excluídos por não preencherem os critérios de inclusão da pesquisa. Os 137 casos restantes foram avaliados inicialmente pelo método de Sanger, sendo que 88% eram oriundos de um estudo prévio desenvolvido pelo grupo de pesquisa em Diabetes Monogênico da USP (89) e 12% eram provenientes de investigação genética prévia negativa realizada no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional da Universidade Federal de São Paulo (dados não publicados). A positividade encontrada no estudo prévio por Sanger encontra-se descrita na figura 1.

Dos 137 casos índices com suspeita de MODY, 80 probandos apresentaram a análise genética prévia por Sanger negativa e foram recrutados para este estudo por SLE. Destes 80 pacientes, 23 casos índices tinham suspeita inicial de MODY-GCK e análise genética prévia negativa para este gene, enquanto que 57 probandos apresentavam suspeita de MODY “não-GCK” e investigação prévia negativa para o gene *HNF1A* (figura 1).

Figura 1 – Casuística do estudo molecular por painel de SLE: pacientes com diagnóstico clínico de MODY e análise genética prévia negativa

3.5- Estudo Genético-Molecular

3.5.1- Estratégia do Estudo

Os casos selecionados para o estudo por SLE foram submetidos ao sequenciamento simultâneo de um painel customizado de genes alvo e posterior análise dos genes possivelmente associados ao fenótipo do paciente.

Os resultados obtidos por SLE foram confirmados por sequenciamento de Sanger. As variantes alélicas identificadas consideradas patogênicas foram correlacionadas com o fenótipo e foi realizada a segregação familiar.

3.5.2- Extração do DNA Genômico

As amostras de DNA dos pacientes selecionados e seus familiares foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico. O DNA foi extraído de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Celular - LIM25, FMUSP (92). A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A integridade do DNA foi verificada em seguida, utilizando eletroforese em gel de agarose. Todas as amostras foram congeladas e são mantidas estocadas a menos 20°C.

3.5.3- Sequenciamento em Larga Escala (SLE)

3.5.3.1- Painel Gênico Customizado

O sequenciamento paralelo em larga escala (SLE) utilizado neste estudo foi direcionado para regiões gênicas alvo (*Targeted-NGS*), através de um painel customizado.

O painel de genes foi desenhado para uso em diversos projetos do nosso grupo de pesquisa, com o intuito de investigar pacientes com suspeita de Diabetes Monogênico. Por uma questão de custo-benefício, pacientes com diferentes formas de diabetes monogênico foram sequenciados na mesma corrida de SLE. Após o sequenciamento, a análise de bioinformática dos dados genômicos gerados foi direcionada para os genes associados à condição em questão (com base no fenótipo do paciente).

O painel de SLE customizado para este estudo foi elaborado a partir da ferramenta Agilent SureDesign (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e incluiu 51 genes nucleares já previamente associados aos diferentes tipos de diabetes monogênico [14 genes de MODY, sendo 7 genes associados somente a MODY (*HNF4A*, *HNF1A*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *BLK*, *APPL1*) e 7 genes associados tanto a MODY quanto a diabetes neonatal (*GCK*, *PDX1*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *INS*, *ABCC8*, *KCNJ11*), 17 genes associados apenas a diabetes neonatal (*PTF1A*, *NEUROG3*, *RFX6*, *ZFP57*, *GLIS3*, *IER3IP1*, *GATA6*, *GATA4*, *EIF2AK3*, *SLC19A2*, *SLC2A2*, *CP*, *PLAGL1*, *HYMAI*, *NKX2-2*, *MNX1*, *PAX6*), 3 genes associados a diabetes monogênico auto-imune (*FOXP3*, *AIRE*, *STAT3*), 2 genes associados a síndrome de Wolfram (*WFS1*, *CISD2*), 1 gene associado às síndromes de resistência insulínica (*INSR*), 11 genes de lipodistrofia (*AGPAT2*, *BSCL2*, *CAV1*, *PTRF*, *LMNA*, *PLIN1*, *ZMPSTE24*, *AKT2*, *CIDEA*, *TBC1D4*, *PPARG*), 3 genes associados a hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar – HHF (*HADH*, *GLUD1*, *SLC16A1*)], em adição ao genoma mitocondrial. Os genes de HHF foram incluídos como potenciais candidatos a novos casos de MODY.

As regiões alvo compreenderam todos os éxons dos genes selecionados, as regiões intrônicas flangeadoras (25pb a montante e a jusante de cada éxon) e as regiões promotoras.

A soma dos fragmentos alvos do painel gênico de Diabetes Monogênico foi de aproximadamente 488 kb, abrangendo todos as regiões codificadoras e fronteiras intrônicas envolvidas.

3.5.3.2- Análise direcionada dos dados gerados por SLE

A análise dos dados gerados pelo SLE foi realizada considerando todos os genes possivelmente associados ao fenótipo do paciente. Foram priorizados os 14 genes previamente associados a MODY. Nos casos em que não foram identificadas variantes patogênicas nesses genes mais prováveis, foram analisados os dados provenientes do sequenciamento de genes potencialmente candidatos, relacionados a diabetes neonatal (outro tipo de diabetes monogênico que tem em comum o mesmo mecanismo etiopatogênico: defeito na secreção de insulina) e genes relacionados a HHF [uma vez que outros genes de HHF já foram previamente associados a MODY, com efeitos opostos na função gênica, como *GCK* (mutações ativadoras em heterozigose no *GCK* levando a HHF e mutações inativadoras em heterozigose resultando em MODY), *ABCC8* e *KCNJ11* (mutações inativadoras nesses genes resultando em HHF)]. A análise desses genes candidatos foi realizada na tentativa de identificar novos genes associados a MODY.

3.5.3.3- Sondas para captura por SLE

Foram sintetizadas sondas específicas para seleção, captura e enriquecimento das regiões genômicas de interesse, com base na metodologia Sure Select XT (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

3.5.3.4- Plataforma de SLE

A plataforma de SLE empregada foi MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA 92122, EUA), escolhida por ser apropriada para estudos do genoma humano, pelas baixas taxas de erro, sobretudo em regiões de homopolímeros (93), e por ser a tecnologia dominante na atualidade suportada pelas principais ferramentas de bioinformática.

3.5.3.5- Etapas do SLE

O processo de SLE compreendeu três etapas fundamentais (figura 2):

1. Preparo das bibliotecas de DNA:

- a. fragmentação mecânica do DNA genômico (por sonicação), gerando fragmentos entre 150 e 550 pb;
- b. ligação dos adaptadores (contendo *primers* universais) às extremidades dos fragmentos e posterior adição dos indexes (“barcodes” que permitem a identificação do paciente no *pool* de amostras sequenciadas);
- c. enriquecimento das bibliotecas com sondas de captura das regiões alvo do painel gênico (sondas biotiniladas ligam-se por complementariedade às regiões gênicas de interesse, permitindo uma posterior “captura” destas regiões através de esferas magnéticas acopladas à estreptavidina);

2. Amplificação clonal (*clusterização*) por meio de uma reação em cadeia da polimerase em ponte (*bridge* PCR). Nesta etapa, os fragmentos de DNA ligados às moléculas adaptadoras são

depositados em uma lâmina especial denominada *flowcell*. Esta lâmina é constituída por canaletas (ou *lanes*), em cuja superfície encontram-se fixados de maneira paralela oligonucleotídeos complementares às moléculas adaptadoras acopladas às extremidades dos fragmentos de DNA das bibliotecas. Após a ligação dos fragmentos aos seus oligonucleotídeos complementares, cada molécula é amplificada várias vezes através de PCR em ponte. Ao final, são gerados *clusters* (clones) de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da *flowcell*.

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

do mesmo fragmento no sentido reverso (do segundo *read*). Isso caracteriza a configuração *paired end* do SLE, que possibilita leituras de fragmentos de até 300 pares de base. Ao final dos ciclos, o equipamento gera um arquivo com todas as sequências.

Figura 2 – Etapas do SLE: 1ª etapa (ilustrações 1 e 2) esquematizando o preparo das bibliotecas; 2ª etapa (ilustração 3): amplificação clonal; 3ª etapa (ilustração 4): sequenciamento. Adaptado de Metzker e colaboradores, 2010 (94).

3.5.3.6- Análise de Bioinformática

O grande volume de dados gerados pelas novas plataformas de SLE requer a utilização de ferramentas de bioinformática elaboradas, a fim de que as poucas alterações genéticas de interesse sejam identificadas em meio a

centenas ou milhares de variantes não relacionadas ao fenótipo (polimorfismos) (80).

Após o sequenciamento, a análise de bioinformática dos dados genômicos gerados pelo SLE foi realizada em etapas, através de diversos programas (*softwares*) que funcionam em cadeia (*pipelines*):

[1] armazenamento dos dados brutos gerados pelo sequenciamento (sequências propriamente ditas – arquivos com extensão .FASTQ);

[2] verificação da qualidade: checagem automatizada (QualiMap, BaseSpace) da consistência dos arquivos gerados no processo de sequenciamento (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de gigabytes) e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas por amostra;

[3] alinhamento das sequências das amostras ao genoma humano de referência (hg19/UCSC ou GRCh37/NCBI), gerando um arquivo com extensão .BAM (processo realizado pelo programa BWA <http://bio-bwa.sourceforge.net/>);

[4] recalibragem das sequências alinhadas. Como o alinhamento é feito sequência a sequência individualmente, torna-se necessário recalibrá-lo, visto que fragmentos oriundos da mesma região cromossômica podem apresentar resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (por exemplo, quando existem pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma alvo). A recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma contextualizada.

[5] genotipagem ou “chamada das variantes”: determinação, com bases estatísticas, de todos os alelos do genoma da amostra, para identificar variantes – SNVs (*single nucleotide variants*: variantes de um único

nucleotídeo) e *indels* (pequenas deleções e inserções). É feita a listagem de todas as alterações divergentes da sequência de referência (variantes alélicas), gerando o arquivo .VCF (*variant call format*). Tipicamente são listadas centenas ou milhares de variantes, o que tornaria impossível a verificação manual de cada uma delas. A ferramenta utilizada nessa etapa é *Freebayes* (*Bayesian haplotype-based genetic polymorphism discovery and genotyping* <https://github.com/ekg/freebayes>);

[6] anotação das variantes detectadas: processo automatizado realizado pela ferramenta *AnnoVar* (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>). Nessa etapa, para cada uma das variantes alélicas, foram coletadas informações a partir de:

- a) bancos de dados genômicos populacionais (*1000 Genomes Project*; *Exome Sequencing Project - ESP6500*; *Exome Aggregation Consortium - ExAC*);
- b) algoritmos de predição *in silico* do impacto funcional da variante:
 - PolyPhen2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>;
 - SIFT: <http://sift.jcvi.org/>;
 - PROVEAN: <http://provean.jcvi.org/index.php>;
 - *Mutation Taster*: <http://www.mutationtaster.org/>;
 - *MutationAssessor*: <http://mutationassessor.org/>;
 - GERP: <http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/index.html>;
 - CADD: <http://cadd.gs.washington.edu/>.

Ao final dessa etapa é gerada a VCF anotada, que contém todas as variantes identificadas e suas respectivas informações (como localização, tipo, frequência alélica, consequência, predição do impacto funcional).

3.5.3.7- Análise e priorização das variantes anotadas

No processo de análise dos resultados do SLE são aplicados filtros de priorização, a fim de gerar uma lista ordenada e, de preferência, com poucas variantes selecionadas para maior investigação, isto é, para auxiliar no processamento e distinção das variantes genéticas causadoras de doenças (ou potencialmente relacionadas com o fenótipo do paciente) diante do enorme número de variantes candidatas sequenciadas (80).

Não existem critérios fixos e padronizados para esta priorização. Em geral, considera-se parâmetros como frequência alélica em bancos de dados populacionais, relação do gene com o fenótipo estudado, tipo de mutação, predição da variante como supostamente deletéria ou não, dados de alinhamento (como quantidade de *reads* identificando a variante).

3.5.3.8- Frequência estimada de MODY

Consideramos inicialmente um valor de corte da frequência alélica menor que 1%, visando selecionar as variantes raras, e em seguida priorizamos variantes com frequência abaixo da prevalência mínima estimada de MODY de 0,01% (esta frequência estimada de MODY de 108 casos por milhão foi determinada em uma casuística bem estabelecida no Reino Unido) (17). As variantes com MAF (*minor allele frequency*) menor que 1%, porém acima de 0,01%, foram consideradas para análise caso já tivessem sido descritas em outras famílias associadas ao fenótipo de MODY.

3.5.3.9- Visualização das variantes selecionadas

As variantes alélicas consideradas relevantes foram confirmadas visualmente pelo software IGV (*Integrative Genomics Viewer*) – <http://software.broadinstitute.org/software/igv/> (figura 3). Esse programa permite a visualização das variantes selecionadas, a fim de afastar falsas variantes chamadas incorretamente na etapa de genotipagem.

Figura 3: Exemplos de visualização de uma variante não sinônima ou missense (acima) e de uma deleção (abaixo), no programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*).

3.5.3.10- Análise da Patogenicidade das variantes alélicas candidatas

As variantes alélicas relevantes foram avaliadas quanto ao seu grau de patogenicidade conforme as recomendações da Sociedade Americana de Genética Médica (ACMG) (82), considerando:

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

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

A frequência alélica nos bancos de dados genômicos populacionais GnomAD e ABraOM considerada neste estudo foi próxima à frequência esperada para a doença (considerando a prevalência estimada de MODY de 0,01% (17)).

[2] Segregação familiar:

Para auxiliar a interpretação dos dados de co-segregação familiar, um método matemático (95) foi adicionado às diretrizes da ACMG. O modelo proposto permite uma análise quantitativa dos dados de co-segregação (expressando a probabilidade de ocorrer segregação se a variante não for patogênica, ou seja, informando a chance da variante observada ocorrer ao acaso ao invés de acontecer devido à transmissão da alteração alélica associada à herdabilidade da doença).

[3] Dados Preditivos:

a) Tipo de variante: certos tipos alteram frequentemente a função do gene (*null variants*) - *nonsense*, *frameshift*, variantes em sítios canônicos de *splice* ($\pm 1-2$ pb), códon de iniciação, deleção de um ou vários éxons.

b) Predição *in silico*: evidências computacionais de efeito deletério no gene ou no produto gênico (como conservação do aminoácido afetado entre espécies; localização da alteração na sequência da proteína e seu impacto funcional, consequência bioquímica da substituição do aminoácido).

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

Considerando os critérios acima avaliados, a ACMG recomenda a atribuição de códigos (anexo C) que resultam na classificação das variantes em

5 categorias (anexo D): patogênica; provavelmente patogênica; significado incerto; provavelmente benigna e benigna.

3.5.3.11- Fluxograma de análise das variantes

As variantes alélicas identificadas por SLE do painel de Diabetes Monogênico foram filtradas seguindo o fluxograma representado na figura 4, a fim de selecionar as variantes com maior possibilidade de patogenicidade nos pacientes estudados com suspeita clínica de MODY.

Figura 4 - Fluxograma de filtragem utilizado na interpretação das variantes identificadas no painel de SLE deste estudo

MAF (*minor allele frequency*): frequência alélica mínima; *Allele counting* (AC): número de alelos encontrados com a variante, sendo que AC < 3 significa que a variante analisada foi encontrada em menos de 3 pacientes da casuística.

3.5.4- Sequenciamento Automático Tradicional (Sanger)

A técnica de sequenciamento de Sanger foi utilizada em 2 momentos neste estudo:

1º) Seleção da casuística:

Os casos selecionados para análise por SLE haviam sido avaliados previamente pelo método de Sanger, conforme mencionado anteriormente. Foram sequenciados todos os éxons de um dos 2 genes alvos (*GCK* ou *HNF1A* – genes associados aos 2 tipos mais prevalentes de MODY). A escolha do gene foi feita com base no fenótipo. Os pacientes com resultado genético negativo foram selecionados para este estudo.

2º) Confirmação dos achados moleculares do SLE e segregação familiar:

As variantes alélicas relevantes identificadas por SLE, e classificadas como mutações pontuais ou pequenas *indels*, foram confirmadas pela técnica de Sanger. Essa análise confirmatória por Sanger foi direcionada apenas para a região gênica onde foi encontrada a mutação (não foram sequenciados todos os éxons do gene afetado). Tal validação foi realizada, pois, até o presente momento, o método de Sanger é considerado o padrão-ouro de sequenciamento. Além disso, o sequenciamento por Sanger direcionado para a variante identificada também foi realizado para análise molecular dos familiares disponíveis para estudo.

A análise genética por Sanger foi baseada na amplificação da região codificadora do gene alvo, utilizando *primers* intrônicos flanqueando essa região, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo. 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®). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies™). Os produtos desta reação foram submetidos a uma eletroforese capilar no sequenciador automático ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise dos eletroferogramas foi realizada utilizando o *software* Sequencher (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, EUA).

3.5.5- Fluxograma do estudo

A estratégia de investigação molecular deste estudo está representada esquematicamente na figura 5.

Figura 5 – Fluxograma da estratégia do estudo genético-molecular de MODY utilizando sequenciamento em larga escala (SLE)

4- RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- Características clínico-laboratoriais da casuística analisada

As características clínicas e laboratoriais dos 80 casos índices não-relacionados, com suspeita de MODY, que foram avaliados neste estudo, encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Características clínico-laboratoriais dos pacientes com suspeita de MODY

Parâmetros analisados	N	Dados obtidos
Suspeita clínica inicial	80	
MODY-GCK		23 (29%)
MODY Não-GCK		57 (71%)
Sexo	80	
Feminino		49 (61%)
Masculino		31 (39%)
Idade ao diagnóstico de hiperglicemia (anos)	80	
Média ± DP		21 ± 8,7
Mediana (Mín - Máx)		20 (3–35)
Duração da hiperglicemia (anos)	80	
Média ± DP		17,4 ± 13
Mediana (Mín - Máx)		13 (3–63)
Peso referido ao diagnóstico ^a	77	
Não-obesos ^b		67 (88%)
IMC atual (Kg/m²) ^c	80	
Média ± DP		24,2 ± 4,2
Mediana (Mín - Máx)		24,65 (14–36)
História familiar de DM/pré-DM	80	
Presente ^d		78 (97,5%)
Ausente		2 (2,5%)

continua

Tabela 1 (conclusão) – Características clínico-laboratoriais dos pacientes com suspeita de MODY

Parâmetros analisados	N	Dados obtidos
Anticorpos anti-células beta^e	80	
Negativos		67 (84%)
Não realizados ^f		13 (16%)
Peptídeo C após 3 anos do diagnóstico (ng/mL)	68	
Média ± DP		1,9 ± 0,8
Mediana (Mín - Máx)		1,7 (0,63–3,8)

^a Peso referido pelo paciente (diante da ausência de dados antropométricos ao diagnóstico para a maioria dos pacientes).

^b Pacientes magros ou com peso referido normal.

^c IMC: índice de massa corporal.

^d História familiar presente em pelo menos 2 gerações consecutivas.

^e Anticorpos anti-células beta: anti-ácido glutâmico (anti-GAD), anti-tirosina fosfatase (anti-IA2), anti-insulina (anti-IAA).

^f Anticorpos não realizados em casos com longa duração da hiperglicemia quando foi efetuada a primeira avaliação por suspeita de MODY.

4.2- Sequenciamento em Larga Escala (SLE)

4.2.1- Validação do método e do painel de SLE

A técnica de SLE encontra-se validada e não requer relato de monitoramento ou análise de controles positivos por outro método, sendo importante uma avaliação contínua da qualidade específica da corrida de SLE (96).

Já a validação do painel gênico customizado deste estudo, visando uma alta qualidade da pesquisa molecular, foi realizada por meio da análise do desempenho deste painel de SLE, isto é, pela avaliação das métricas de qualidade e cobertura do sequenciamento em questão.

4.2.2- Métricas de qualidade do painel de SLE

Foram realizadas 4 corridas de SLE, totalizando os 80 casos selecionados para o estudo. A cobertura média geral foi de 228 ± 152 reads (fragmentos sequenciados). Uma cobertura de no mínimo 20x foi obtida em 98,2% das regiões alvo do painel (tabela 2).

Tabela 2 – Métricas do painel de SLE do estudo

Parâmetros analisados	1ª corrida SLE	2ª corrida SLE	3ª corrida SLE	4ª corrida SLE	Total
Número de pacientes sequenciados	13	28	16	23	80
Média de reads gerados	457.447	608.733	792.066	706.173	647.595
Média de bases sequenciadas (pb)	61.322.120	80.307.454	107.281.882	98.585.402	87.872.133
Cobertura média (x) $\pm$ desvio padrão	295 $\pm$ 164	301 $\pm$ 132	173 $\pm$ 136	159 $\pm$ 127	228 $\pm$ 152
% da região alvo com cobertura maior que 10 reads	99,6	99,8	98,7	98,8	99,3
% da região alvo com cobertura maior que 20 reads	99,1	99,4	97,4	97,3	98,2

pb: pares de base; x: vezes; %: porcentagem

4.2.3- Variantes alélicas detectadas pelo painel de SLE

O painel de SLE de Diabetes Monogênico identificou em média 2949 ($\pm$ 449) variantes no total de 4 corridas. Ao considerar o padrão de herança autossômica dominante de MODY, a média de variantes em heterozigose por paciente foi de 759 ($\pm$ 19). A tabela 3 apresenta o total de variantes por corrida e a redução do número de variantes após aplicação dos filtros de priorização da análise.

Tabela 3 – Total de variantes alélicas identificadas pelo painel de SLE, número de variantes por paciente e número final de variantes selecionadas como potencialmente deletérias

Corrida de SLE	Total de variantes por corrida	Total de variantes em heterozigose por paciente (média / DP)	Número final de variantes de interesse por paciente
1 ^a	3023	775 ± 83	1
2 ^a	3312	775 ± 40	1
3 ^a	3162	740 ± 74	1 - 2
4 ^a	2299	746 ± 67	1

Do total de 80 casos estudados com análise genética prévia negativa pelo método de Sanger, após análise dos resultados do SLE, seguindo o fluxo de filtragem e priorização pré-estabelecidos, foram identificadas 39 variantes de interesse em 38 probandos. Estas 39 variantes foram classificadas de acordo com os critérios da ACMG, sendo: 14 variantes patogênicas, 2 variantes provavelmente patogênicas, 16 variantes de significado incerto, 5 variantes provavelmente benignas e 2 variantes benignas (tabela 4).

Somando as variantes patogênicas e provavelmente patogênicas identificadas, o diagnóstico genético de MODY foi confirmado pelo painel de SLE em 20% dos casos (16/80). Se considerarmos que os 15 casos com variantes de significado incerto (total de 16 variantes) podem ainda ser reclassificados como patogênicos (a depender de estudos futuros), seria possível atingir uma positividade de até 39%.

Dos 80 casos, 42 ainda permaneceram sem diagnóstico molecular esclarecido mesmo após SLE (não foram identificadas variantes possivelmente patogênicas nos genes estudados no painel).

Tabela 4 – Variantes alélicas candidatas identificadas por SLE nos pacientes analisados com suspeita clínica de MODY e classificadas de acordo com os critérios de patogenicidade da ACMG

P ^A	Gene	Variante	Efeito na proteína	Tipo de variante	Frequência Alélica		Predição <i>in silico</i> ^B					Ref
					GnomAD	ABraOM	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen2	CADD	GERP	
Variantes Patogênicas												
P1	GCK	c.1340_1368del29	p.ArgR447Lfs*2	frameshift	0	0	D	--	--	--	--	(97)
P2		c.544G>A	p.Val182Met	missense	0	0	D	0 / D	0,999 / D	32,0	5,83	(98)
P3		c.952G>A	p.Gly318Arg	missense	0	0	D	0 / D	0,749 / P	19,8	3,89	(99)
P4		c.952G>A	p.Gly318Arg	missense	0	0	D	0 / D	0,749 / P	19,8	3,89	(99)
P5		c.703A>G	p.Met235Val	missense	0	0	D	0,35 / T	0,325 / B	18,3	5,33	(100)
P6		c.976A>C	p.Thr326Pro	missense	0	0	D	0,01 / D	0,012 / B	13,9	3,59	(101)
P7	HNF1A	c.1513C>A	p.His505Asn	missense	0,02%	0	D	0,01 / D	0,962 / D	26,1	5,52	(102)
P8	HNF1B	c.884G>A	p.Arg295His	missense	0	0	D	0,03 / D	0,977 / D	34,0	5,56	(46)
P9	ABCC8	c.2473C>T	p.Arg825Trp	missense	0,001%	0	D	0 / D	1,0 / D	21,4	5,20	(103)
P10	PDX1	c.188delC	p.Arg63Rfs*60	frameshift	0	0	D	--	--	--	--	(49)
P11	PAX4	c.361C>T	p.Arg121Trp	missense	0,12%	0,08%	D	0 / D	1,0 / D	33,0	2,47	(104)
P12		c.361C>T	p.Arg121Trp	missense	0,12%	0,08%	D	0 / D	1,0 / D	33,0	2,47	(104)
P13	NEUROD1	c.693C>G	p.Tyr231Ter	nonsense	0	0	D	--	--	35,0	-0,14	Nova
P14	NEUROG3	c.82G>T	p.Glu28Ter	nonsense	0	0	D	--	--	30,0	1,66	(105) *
Variantes Provavelmente Patogênicas												
P15	HNF4A	c.145C>T	p.His49Tyr	missense	0	0	D	0 / D	1,0 / D	32,0	5,17	Nova
P16	KCNJ11	c.286G>A	p.Ala96Thr	missense	0,003%	0	D	0,66 / T	0,687 / P	14,6	4,94	(106) **

continua

Tabela 4 (continuação) – Variantes alélicas candidatas identificadas por SLE nos pacientes analisados com suspeita clínica de MODY e classificadas de acordo com os critérios de patogenicidade da ACMG

P ^A	Gene	Variante	Efeito na proteína	Tipo de variante	Frequência Alélica		Predição <i>in silico</i> ^B					Ref
					GnomAD	ABraOM	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen2	CADD	GERP	
Variantes de Significado Incerto												
P17	<i>HNF1B</i>	c.226G>T	p.Gly76Cys	<i>missense</i>	0,23%	0,41%	D	0,03 / D	1,0 / D	27,2	5,13	(47)
P18	<i>PDX1</i>	c.664G>A	p.Glu222Lys	<i>missense</i>	0,006%	0,16%	D	0,34 / T	0,173 / B	15,7	3,95	Nova
P19	<i>INS</i>	c.17G>A	p.Arg6His	<i>missense</i>	0,03%	0	P	0,37 / T	0,009/ B	14,4	0,62	(107)
P20		c.157A>T	p.Ser53Cys	<i>missense</i>	0	0	D	0,18 / T	0,214 / B	24,6	5,19	Nova
P21		c.2017G>A	p.Asp673Asn	<i>missense</i>	0,01%	0	P	0,07 / T	0,062 / B	13,0	3,21	(108)***
P22	<i>ABCC8</i>	c.1688T>A	p.Val563Asp	<i>missense</i>	0	0	D	0,08 / T	0,844 / P	24,5	3,16	Nova
P23		c.1973G>T	p.Gly658Val	<i>missense</i>	0,02%	0	D	0,06 / T	0,001 / B	5,8	2,44	Nova
P24		c.3053C>T	p.Ser1018Leu	<i>missense</i>	0,003%	0	D	0,14 / T	0,127 / B	23,5	6,03	Nova
	c.796A>G	p.Lys266Glu	<i>missense</i>	0	0	D	0,03 / D	0,067 / B	23,4	5,36	Nova	
P25	<i>CEL</i>	c.305A>C	p.Asp102Ala	<i>missense</i>	0	0	D	0 / D	0,935 / D	23,2	5,16	Nova
P26		c.71C>T	p.Ala24Val	<i>missense</i>	0,01%	0	D	0,04 / D	0,426 / B	16,3	4,11	Nova
P27	<i>BLK</i>	c.1013T>C	p.Ile338Thr	<i>missense</i>	0,01%	0	D	0 / D	0,992 / D	24,9	4,62	Nova
P28	<i>RFX6</i>	c.695C>T	p.Ser232Leu	<i>missense</i>	0,06%	0	D	0,04 / D	0,294 / B	34,0	5,77	Nova
P29	<i>GLIS3</i>	c.2194T>C	p.Tyr732His	<i>missense</i>	0,001%	0	D	0 / D	0,998 / D	27,8	5,92	Nova
P30	<i>CP</i>	c.1726A>G	p.Lys576Glu	<i>missense</i>	0,003%	0,16%	D	0,1 / T	0,814 / P	23,8	6,07	Nova
P31	<i>SLC19A2</i>	c.1380C>T	p.Ala460Ala	sinônima	0,03%	0,08%	D	--	--	--	--	Nova

continua

Tabela 4 (conclusão) – Variantes alélicas candidatas identificadas por SLE nos pacientes analisados com suspeita clínica de MODY e classificadas de acordo com os critérios de patogenicidade da ACMG

P ^A	Gene	Variante	Efeito na proteína	Tipo de variante	Frequência Alélica		Predição <i>in silico</i> ^B					Ref
					GnomAD	ABraOM	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen2	CADD	GERP	
Variantes Provavelmente Benignas												
P32	INS	c.227G>A	p.Ser76Asn	missense	0,14%	0	P	0,59 / T	0,173 / B	2,1	1,15	Nova
P33	ABCC8	c.703G>A	p.Ala235Thr	missense	0,003%	0,08%	P	1,0 / T	0,001 / B	9,0	0,88	Nova
P34	BLK	c.571C>A	p.Pro191Thr	missense	0,05%	0	D	0,92 / T	0,281 / B	9,4	4,57	Nova
P35	CEL	c.606G>A	p.Ala202Ala	sinônima	0,03%	0	P	--	--	--	--	Nova
P36	PLAGL1	c.940G>T	p.Ala314Ser	missense	0,05%	0,08%	P	0,93 / T	0,018 / B	6,4	2,52	Nova
Variantes Benignas												
P37	HNF4A	c.1321A>G	p.Ile441Val	missense	0,07%	0,08%	D	0,02 / D	0,078 / B	15,2	5,23	(109)
P38	HNF1B	c.182T>G	p.Val61Gly	missense	0,34%	0,08%	D	0,25 / T	0,007 / B	15,4	5,13	(110)

^A P: probando

^B Critérios dos algoritmos preditivos *in silico* utilizados na interpretação das variantes:

Predição *in silico* de patogenicidade:

- MutationTaster: D (deletério); P = polimorfismo
- SIFT: *score* ≤ 0,05 = D (deletério); *score* > 0,05 = T (tolerado)
- PolyPhen2 (HVAR): *score* ≥ 0,909 = D (deletério); *score* 0,447–0,909 = P (possivelmente deletério); *score* ≤ 0,446 = B (benigno)
- CADD (phred): *score* ≥ 10 (predição da variante estar entre as 10% mais deletérias); *score* ≥ 20 (indica variante 1% mais deletéria)

Predição de conservação do aminoácido envolvido:

- GERP: *score* > 2 (indica aminoácido conservado evolutivamente)

* Variante já descrita associada a diabetes neonatal

** Variante já descrita associada a hiperinsulinismo congênito

*** Variante já descrita como de significado incerto associada a diabetes neonatal

4.2.4- Variantes alélicas patogênicas e provavelmente patogênicas detectadas por SLE

Das 16 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas identificadas (figura 6), 6 foram no gene *GCK*, 1 no gene *HNF1A*, 1 no gene *HNF4A*, 1 no gene *HNF1B*, 6 em genes de MODY considerados raros, que não são avaliados na rotina (1 no *ABCC8*, 1 no *KCNJ11*, 1 no *PDX1*, 2 no *PAX4*, 1 no *NEUROD1*). Uma variante patogênica foi detectada em um gene associado apenas a diabetes neonatal (105), sem descrição prévia de associação com MODY.

Figura 6 – Variantes patogênicas e provavelmente patogênicas detectadas por SLE

Destas 16 variantes deletérias, 14 já haviam sido descritas previamente, exceto as dos genes *HNF4A* e *NEUROD1* (tabela 4).

Todas essas mutações foram confirmadas pelo método de Sanger.

Um aspecto importante na avaliação da patogenicidade das variantes identificadas por SLE foi a análise de segregação familiar, por meio do sequenciamento de Sanger direcionado para a mutação encontrada no probando. Das 16 mutações, a segregação familiar foi possível em 13 casos, em que os familiares encontravam-se disponíveis para coleta do exame genético. Dos 13 casos segregados (heredogramas ilustrados na figura 7), a co-segregação foi concordante em 8 famílias. Destas, chama atenção a família com uma variante nova no gene *HNF4A*, em que a análise genética foi compatível com o fenótipo, contribuindo para a classificação de provável patogenicidade obtida após aplicação dos critérios da ACMG. Das 5 famílias com co-segregação conflitante, em 2 casos (genes *PDX1* e *PAX4*), os indivíduos com fenótipo de DM e genótipo sem mutação eram relacionados a outros tipos de diabetes na mesma família (27). Nos outros 3 casos (genes *ABCC8*, *KCNJ11*, *HNF1B*), os familiares portadores da variante alélica, porém sem quadro clínico de DM, poderiam ser explicados pelo fenômeno de penetrância incompleta (111).

Figura 7 – Heredogramas das famílias do estudo em que a mutação do probando foi identificada por SLE.

Setas indicam os probandos. Quadrados representam os pacientes do sexo masculino e círculos os do sexo feminino. Losangos simbolizam familiares de sexo não conhecido. Indivíduos com hiperglicemia (DM ou glicemia de jejum alterada ou intolerância à glicose) são indicados por símbolos pretos. Indivíduos não diabéticos são representados por símbolos abertos. Ponto de interrogação no interior do símbolo indica estado glicêmico desconhecido. Ponto de interrogação abaixo do símbolo indica genótipo desconhecido. O genótipo é indicado por: *N*, alelo selvagem e *M*, alelo mutante.

4.2.4.1- Mutações no gene *GCK*

Das 6 variantes encontradas no gene *GCK* pelo painel de SLE, 1 era do tipo *frameshift* (éxon 10: c.1340_1368del29/p.R447fs). Cinco variantes eram do tipo *missense*: 3 casos com variantes no éxon 8 (c.976A>C/p.T326P e c.952G>A/p.G318R, sendo esta última variante detectada em 2 probandos não relacionados), 1 caso com variante no éxon 5 (c.544G>A/p.V182M) e 1 caso no éxon 7 (c.703A>G/p.M235V).

Todas as variantes no *GCK* já haviam sido associadas a MODY em diferentes populações (97-101).

As 6 variantes não tinham sido detectadas na análise prévia pelo método de Sanger por: a) 4 casos falso negativos no sequenciamento por Sanger, sendo 3 (c.976A>C/p.T326P e os 2 casos com a variante c.952G>A/p.G318R) devido ao fenômeno genético de *allelic dropout* (quando há uma troca de nucleotídeo na região de anelamento do *primer*, não ocorrendo amplificação do alelo mutado) e 1 caso (c.1340_1368del29) por erro na leitura do eletroferograma; b) 2 casos (c.544G>A/p.V182M e c.703A>G/p.M235V) por erro na hipótese clínica inicial do subtipo de MODY (baseada no padrão glicêmico e na resposta terapêutica dos pacientes), levando ao sequenciamento prévio de outro gene (esses 2 pacientes apresentavam bom controle glicêmico em uso de sulfoniluréia e por isso tinha sido aventada a hipótese de MODY-*HNF1A*).

Os 6 casos foram avaliados quanto à co-segregação familiar e em todos o genótipo foi concordante com o fenótipo (figura 7).

4.2.4.2- Mutação no gene *HNF1A*

No éxon 8 do gene *HNF1A* foi identificada pelo painel de SLE uma variante *missense* c.1513C>A/p.H505N, já descrita anteriormente (102).

Esta variante não tinha sido detectada no estudo prévio do gene *HNF1A* pelo método de Sanger, por um erro de leitura devido ao sinal baixo no eletroferograma (caso falso negativo no Sanger).

A análise de co-segregação familiar deste caso foi concordante com o fenótipo (figura 7), porém com dados insuficientes, uma vez que apenas 1 membro da família (além do probando) encontrava-se disponível para o estudo.

4.2.4.3- Mutação no gene *HNF4A*

A mutação identificada no gene *HNF4A* era do tipo *missense* no éxon 2 (c.145C>T/p.H49Y) e não foi descrita previamente (variante nova).

A paciente apresentava fenótipo semelhante ao do MODY 3 e por isso o gene sequenciado anteriormente tinha sido o *HNF1A*.

Conforme já mencionado, a análise genética foi compatível com o fenótipo nesta família (figura 7).

4.2.4.4- Mutação no gene *HNF1B*

A variante *missense* identificada no gene *HNF1B* no éxon 4 (c.884G>A/p.R295H) já havia sido descrita previamente em uma família francesa (46).

O probando deste estudo com esta variante no *HNF1B* não apresentava relato prévio de cistos renais ou malformações genito-urinárias e por isso não tinha sido considerada a hipótese clínica de MODY5. Após o resultado do SLE, foi realizada uma investigação direcionada e foi detectada, pelo exame de ressonância abdominal, agenesia de corpo e cauda de pâncreas e pequeno cisto no terço médio do rim esquerdo, compatíveis com o fenótipo de MODY-*HNF1B*.

4.2.4.5- Mutações nos genes do canal de potássio: *ABCC8* e *KCNJ11*

Os genes do canal de potássio da célula beta pancreática são relacionados mais frequentemente a casos de diabetes neonatal. Diante da associação recente ao fenótipo de MODY, com poucos casos descritos na literatura, estes genes habitualmente não são sequenciados na rotina de Sanger.

A mutação identificada no gene *ABCC8* era do tipo *missense* no éxon 20 (c.2473C>T/p.R825W) e já foi descrita associada a MODY em uma família francesa (103).

A variante *missense* detectada no gene *KCNJ11* no éxon 1 (c.286G>A/p.A96T) já havia sido descrita previamente, porém associada a outro fenótipo, de hiperinsulinismo congênito (106).

4.2.4.6- Mutação no gene *PDX1*

No gene *PDX1* foi detectada uma variante já descrita (49) do tipo *missense* no éxon 1 (c.188delC/p.P63Rfs*60). Este gene também não foi avaliado anteriormente por Sanger, pois está associado a um subtipo raro de MODY.

O probando com MODY-*PDX1* apresentava ao exame de tomografia abdominal (realizada após confirmação da etiologia genética) agenesia parcial dorsal do pâncreas e também elastase fecal reduzida (indicando insuficiência pancreática exócrina). O filho do caso índice, também portador da mesma variante alélica, apresentava intolerância à glicose e agenesia pancreática semelhante (27).

4.2.4.7- Mutações no gene *PAX4*

A mesma variante *missense* (c.361C>T/p.R121W) foi identificada no éxon 3 do gene *PAX4* em 2 casos não relacionados deste estudo.

Por estar associado a um subtipo raro de MODY, este gene também não tinha sido sequenciado previamente por Sanger.

Esta variante no *PAX4* já foi descrita em uma coorte japonesa que incluía pacientes com história familiar de DM e alguns com início precoce de hiperglicemia (104).

Dos 2 casos com mutação no *PAX4* em nossa casuística, apenas um probando tinha familiares disponíveis para análise de co-segregação (figura 7).

4.2.4.8- Mutação no gene *NEUROD1*

O SLE identificou uma variante *nonsense* (c.693C>G/p.Y231X) no éxon 2 do gene *NEUROD1*.

Este gene está associado a um subtipo raro de MODY e a variante detectada não tinha sido descrita previamente.

A análise de co-segregação familiar não foi realizada por falta de familiares disponíveis para o estudo.

Apesar da falta de evidência em relação aos dados de segregação, esta variante foi considerada patogênica após aplicação dos demais critérios da ACMG.

4.2.4.9- Mutação no gene *NEUROG3*

O painel de SLE deste estudo identificou uma variante *nonsense* (c.82G>T/p.E28X) no gene *NEUROG3*.

Este gene está associado a diabetes neonatal, outro tipo de diabetes monogênico, também relacionado à deficiência na secreção de insulina, com início no primeiro ano de vida. O *NEUROG3* ainda não foi associado ao fenótipo de MODY.

Esta variante detectada já foi descrita previamente em um caso de diabetes neonatal, em heterozigose composta (105), e neste estudo foi verificada em heterozigose e considerada patogênica conforme os critérios da ACMG.

A análise de co-segregação familiar não foi realizada por falta de familiares disponíveis para o estudo.

4.3- Características clínico-laboratoriais dos pacientes com diagnóstico genético confirmado de MODY

Os probandos com variantes patogênicas e provavelmente patogênicas foram avaliados quanto ao seu quadro fenotípico, incluindo dados clínicos e laboratoriais, como: idade na época do diagnóstico da hiperglicemia, história familiar de diabetes, reserva da secreção endógena de insulina (peptídeo C) após 3 anos do diagnóstico de DM, exames laboratoriais de seguimento para avaliação do *status* glicêmico (variabilidade da glicemia de jejum e da hemoglobina glicada), tratamento antes do diagnóstico genético e presença de complicações crônicas microvasculares relacionadas ao diabetes. Tais dados encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Dados clínico-laboratoriais dos casos com diagnóstico genético confirmado de MODY por SLE

P ^A	Hipótese diagnóstica Inicial	SLE	Idade ao diagnóstico (anos)	História familiar (gerações)	TOTG ^B	Peptídeo C após 3 anos de DM	Seguimento ^C (mín - máx)	Tratamento	Complicações microvasculares
P1	MODY-GCK	GCK p.R447Lfs*2	15	3	0': 111 120': 182	1,6	GJ: 117–122 A1c: 5,9–6,2	Dieta	Ausentes
P2	MODY não-GCK	GCK p.V182M	8	2	0': 114 120': 106	2,1	GJ: 89–176 A1c: 6,0–8,2	Sulfonilureia	Ausentes
P3	MODY-GCK	GCK p.G318R	35	2	0': 108 120': 197	1,3	GJ: 110–146 A1c: 5,4–6,0	Dieta. Insulina na gravidez	Ausentes
P4	MODY-GCK	GCK p.G318R	14	3	ND	1,7	GJ: 87–139 A1c: 5,9–6,5	Sulfonilureia	Ausentes
P5	MODY não-GCK	GCK p.M235V	10	3	0': 131 120': 218	2,5	GJ: 73–139 A1c: 6,6–7,2	Sulfonilureia	Ausentes
P6	MODY-GCK	GCK p.T326P	28	3	ND	3,0	GJ: 89–112 A1c: 5,9–6,6	Dieta	Ausentes
P7	MODY não-GCK	HNF1A p.H505N	17	2	ND	2,9	GJ: 111–219 A1c: 6,2–7,5	Sulfonilureia	Ausentes
P8	MODY não-GCK	HNF1B p.R295H	12	ausente	0': 97 120': 244	2,4	GJ: 88–120 A1c: 5,7–6,8	iDPP4	Ausentes
P9	MODY não-GCK	ABCC8 p.R825W	21	2	ND	2,3	GJ: 90–271 A1c: 6,3–8,4	Sulfonilureia	Retinopatia Nefropatia
P10	MODY não-GCK	PDX1 p.P63Rfs*60	14	3	ND	1,4	GJ: 83–441 A1c: 6,8–9,2	Insulina	Retinopatia

continua

Tabela 5 (conclusão) – Dados clínico-laboratoriais dos casos com diagnóstico genético confirmado de MODY por SLE

P ^A	Hipótese diagnóstica Inicial	SLE	Idade ao diagnóstico (anos)	História familiar (gerações)	TOTG ^B	Peptídeo C após 3 anos de DM	Seguimento ^C (mín - máx)	Tratamento	Complicações Microvasculares
P11	MODY não-GCK	<i>PAX4</i> p.R121W	34	3	ND	2,7	GJ: 160–186 A1c: 8,1–9,1	Sulfonilureia e Metformina	Nefropatia
P12	MODY-GCK	<i>PAX4</i> p.R121W	25	2	ND	ND	GJ: 105 A1c: 5,6	Dieta	ND
P13	MODY não-GCK	<i>NEUROD1</i> p.Y231X	20	2	ND	1,6	GJ: 88 A1c: 6,1–10,0	Sulfonilureia e Metformina	Ausentes
P14	MODY não-GCK	<i>NEUROG3</i> p.E28X	32	2	ND	0,9	GJ: 59–186 A1c: 6,4–8,6	Sulfonilureia	Ausentes
P15	MODY não-GCK	<i>HNF4A</i> p.H49Y	17	2	ND	0,86	GJ: 70–87 A1c: 5,3–7,3	Insulina	Ausentes
P16	MODY não-GCK	<i>KCNJ11</i> p.A96T	20	4	ND	1,4	GJ: 86–258 A1c: 6,4–9,4	Insulina	Ausentes

^A P: probando^B TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose^C Seguimento – GJ: glicemia de jejum ; A1c: hemoglobina glicada

Valores de referência – Glicemia de jejum: 70 – 99 mg/dL; 2 horas após sobrecarga de glicose (120 minutos do TOTG) < 140 mg/dL; A1c: < 5,7%; Peptídeo C de jejum: 1,1 – 4,4 ng/mL

ND: não disponível

iDPP4: inibidor da dipeptidil peptidase-4

5- DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

O painel de SLE deste estudo permitiu a confirmação do diagnóstico genético de MODY em 20% dos casos avaliados (16/80). Se excluirmos desta análise os 5 casos falso negativos pelo método de Sanger, a positividade deste painel reduziria para 14%. Como previamente estabelecido, a taxa de erros no sequenciamento por Sanger é de aproximadamente 7% (112), o que é similar à taxa de 6% (5/80) verificada em nosso estudo. Em contrapartida, se considerarmos que os 15 casos com variantes de significado incerto podem vir a ser reclassificados como patogênicos, a positividade deste painel de SLE poderia aumentar até 39%. Conforme recomendado nas diretrizes (113), uma variante só deve ser reportada como de significado incerto até que evidências posteriores sejam coletadas (como a descoberta de novos indivíduos com fenótipo similar e com variantes deletérias) (80). Os principais pontos que poderiam modificar a classificação de patogenicidade de uma variante de significado incerto seriam a ampliação dos dados de segregação, a detecção da mesma variante em uma segunda família não relacionada (recorrência da variante) e/ou a realização de estudo funcional.

Combinando o desempenho do nosso painel de SLE com dados do estudo prévio por Sanger realizado por nosso grupo de pesquisa (89), do total de 137 casos submetidos a investigação genética para MODY, obtivemos 57 casos confirmados pelo método de Sanger (43 com variantes no gene *GCK* e 14 no *HNF1A*). Dos 80 casos negativos por Sanger, foram confirmados 16 casos pelo painel de SLE, o que nos permite inferir uma positividade final do exame genético para MODY (métodos de Sanger e SLE) de 53% (73/137).

Considerando os pacientes com quadro clínico sugestivo de MODY, porém sem mutações identificadas nos genes conhecidos e avaliados em nosso painel, a frequência de MODY X em nossa coorte foi de 47%.

Outros estudos utilizaram uma estratégia de investigação genética semelhante à nossa, ao avaliarem casos previamente sequenciados pelo método de Sanger com análise subsequente por painel de SLE. Ellard *et al.* avaliaram pacientes com teste prévio negativo para os genes *GKC*, *HNF1A* e/ou *HNF4A* e utilizaram um painel de SLE com 29 genes de diabetes monogênico, identificando a etiologia genética em 15% dos casos (5/33) de MODY (75). Szopa *et al.* estudaram pacientes com rastreamento prévio negativo por Sanger para mutações nos genes *GCK* e *HNF1A*, utilizando um painel de SLE com 28 genes de diabetes monogênico e identificaram mutações em 33% dos casos (18/54) (114). Pezzilli *et al.* avaliaram pacientes com estudo prévio negativo por Sanger para os genes *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *PDX1*, *NEUROD1*, aplicando um painel de SLE com 27 genes de diabetes monogênico e detectaram variantes patogênicas / provavelmente patogênicas em 11% dos casos (6/55) (115). O nosso estudo foi o primeiro a avaliar por SLE pacientes com suspeita de MODY na população brasileira, por meio de um painel com 51 genes de diabetes monogênico, e apresentou performance similar aos estudos previamente reportados.

O processo de classificação de patogenicidade para estabelecer a causalidade de uma variante é complexo (26) e em algumas etapas requer interpretação humana. O uso de *softwares* de predição *in silico* auxilia na avaliação do impacto funcional de uma variante, porém os diferentes programas podem apresentar resultados conflitantes e acurácia variável (80).

Diante das limitações das ferramentas *in silico*, é recomendável utilizar múltiplos programas de predição para comparação, além da associação de outros dados, como a frequência alélica na população e a segregação familiar, para interpretação final da patogenicidade da variante (82).

A frequência alélica em bancos de dados populacionais é um ponto fundamental na priorização das variantes. Em nosso estudo avaliamos a frequência máxima em uma população no banco de dados internacionais GnomAD e também no banco de dados brasileiros ABraOM. Conforme descrito em Métodos, foram incluídas as variantes com MAF maior que 0,01% e menor que 1%. Este valor de corte acima da frequência máxima da doença na população do Reino Unido de 0,01% (17) foi considerado neste estudo, pois a frequência estimada de MODY pode ser maior na população brasileira (miscigenada e com grande diversidade genética). Ao considerarmos que o Brasil tem uma prevalência nacional de DM de 10,2%, com 14.251 em 1000 adultos (20-79 anos) diabéticos (4º país no mundo com maior número de casos de DM na idade adulta) e que o Reino Unido tem uma prevalência de 6,2%, com 2859 em 1000 adultos diabéticos (15), é possível que a prevalência de MODY no Brasil seja maior que a esperada no Reino Unido.

Quanto à segregação familiar, foram verificados em nosso estudo alguns casos discordantes. Nas famílias com variantes nos genes *PDX1* e *PAX4* foram detectados casos com DM, porém sem a variante alélica, e que apresentavam características que lembravam DM tipo 2, como idade tardia ao diagnóstico de DM associado a sobrepeso/obesidade (27). A coexistência entre outro tipo de diabetes e MODY na mesma família já foi relatada em outras casuísticas (49, 111). Outros casos com segregação conflitante no nosso estudo foram vistos

nas famílias com variantes nos genes *ABCC8*, *KCNJ11* e *HNF1B*, em que indivíduos portadores da mutação apresentavam normoglicemia, sugerindo penetrância incompleta (ou seja, apenas uma parcela dos portadores do genótipo apresenta o fenótipo correspondente) ou tardia, como já verificado em outros casos de MODY (58, 111, 116).

Outro critério considerado na avaliação de patogenicidade de uma variante é a análise funcional. As variantes novas detectadas por nosso painel de SLE poderão ser avaliadas por um estudo funcional futuro em nosso laboratório ou em colaboração com outros centros de pesquisa. Entretanto, há limitações dos modelos animais para validação funcional de uma variante alélica. Fenótipos discrepantes entre ratos e humanos com MODY já foram descritos, como em casos de mutações em heterozigose nos genes *HNF1A* (117) e *HNF1B* (118).

Algumas variantes chamaram atenção após sua classificação final segundo os critérios da ACMG:

1- Variante no gene *NEUROG3* (c.82G>T / p.Glu28Ter):

Esta variante foi classificada como patogênica de acordo com os critérios da ACMG. Já foi previamente descrita em associação ao fenótipo de diabetes neonatal (105), porém não há descrição em casos de MODY. Esta variante encontra-se ausente nos bancos populacionais GnomAD e ABraOM. É do tipo *nonsense (null variant: stop gain)*, predita como deletéria pelo MutationTaster e CADD. Entretanto, não temos nenhum dado de segregação familiar disponível. Estudos adicionais são necessários para comprovar a associação desse novo gene ao fenótipo de MODY.

2- Variante no gene *INS* (c.17G>A/p.Arg6His):

Esta variante foi classificada como de significado incerto pelos critérios da ACMG. Apresenta uma MAF baixa no GnomAD (0,03%) e ausente no ABraOM, porém com predição *in silico* controversa (tendendo a benignidade). Já foi descrita por Meur *et al.* (107), mostrando comprometimento da função da proteína no teste funcional. Em relação aos dados de segregação, não temos material disponível para análise da família da nossa casuística e na literatura a co-segregação é conflitante (penetrância tardia?). Diante do aparecimento de novas evidências, esta classificação pode ser modificada, levando a uma associação causal com o fenótipo.

3- Variante no gene *HNF4A* (c.1321A>G/p.Ile441Val):

Esta variante foi classificada pelos critérios da ACMG como benigna. Porém, apresentou uma frequência alélica relativamente baixa (0,07% no GnomAD e 0,08% no ABraOM), sendo predita como deletéria pela maioria dos programas *in silico* e já foi descrita por Malecki *et al.* (109) em uma família com co-segregação conflitante para esta variante no *HNF4A*. Não temos disponível análise de co-segregação na família do nosso estudo. Diante das limitações por dados insuficientes, é possível que esta variante seja reclassificada, caso ocorra a ampliação dos dados de segregação.

4- Variante no gene *HNF1B* (c.182T>G/p.Val61Gly):

Esta variante também foi classificada como benigna pelos critérios da ACMG. Apresentou uma frequência alélica relativamente baixa na população brasileira (0,08% no ABraOM) e maior que a esperada no

GnomAD (MAF de 0,34% em judeus Ashkenazi, sendo a segunda frequência máxima vista na população de europeus finlandeses de 0,09%). Os preditores *in silico* mostraram resultados controversos (predita como deletéria no MutationTaster e CADD, sendo o nucleotídeo altamente conservado evolutivamente na predição pelo GERP, porém predita como benigna no SIFT e PolyPhen2). Esta variante já foi descrita por Edghil *et al.* (110). Entretanto, apresenta estudo funcional sem comprometimento quando comparada à proteína selvagem. Dados de co-segregação familiar são insuficientes na literatura e não temos análise disponível na família do nosso estudo. Devido às limitações por dados escassos ou controversos, esta variante pode ser reclassificada, caso surjam evidências posteriores.

Vale ressaltar que diante dos critérios mais rigorosos de classificação de uma variante alélica, a descrição prévia de uma variante na literatura não implica em associação causal com a doença, como verificado em casos de MODY com variantes no *GCK* (119) e *BLK* (120).

5- Variantes nos genes *ABCC8* (c.3053C>T/p.Ser1018Leu) e *CEL* (c.796A>G/p.Lys266Glu):

Estas duas variantes foram identificadas no mesmo paciente (probando 24) e foram classificadas pelos critérios da ACMG como de significado incerto. Ambas são variantes novas e precisam ser avaliadas quanto a co-segregação familiar e, se possível, por estudo funcional. Interessante destacar a possibilidade de herança digênica neste caso, uma vez que MODY é uma doença classicamente monogênica. Um padrão digênico associado a MODY é muito raro, com poucas famílias descritas (115,

121-123) e ainda com escassas evidências para melhor compreensão do efeito deste padrão de herança sobre a gravidade fenotípica.

6- Variante no gene *PAX4* (c.361C>T/p.Arg121Trp):

Esta variante classificada como patogênica segundo os critérios da ACMG, foi detectada em 2 famílias não relacionadas da nossa casuística, com padrões glicêmicos bem diferentes (um paciente com glicemia de jejum pouco alterada e mantendo controle apenas com dieta, enquanto o outro probando apresentava glicemias mais elevadas e controle glicêmico inadequado mesmo em uso de 2 antidiabéticos orais). A ampliação da segregação nessas 2 famílias e a avaliação clínico-laboratorial de outros membros é importante para melhor caracterização fenotípica. Interessantemente, as 2 famílias do nosso estudo têm origem asiática e as poucas mutações reportadas no *PAX4* até o momento são descritas principalmente em asiáticos (52, 104, 124, 125).

7- Variante no gene *KCNJ11* (c.286G>A/p.Ala96Thr):

Esta variante classificada como provavelmente patogênica, de acordo com os critérios da ACMG, já foi descrita em associação ao fenótipo de hiperinsulinismo congênito (em homozigose em um dos casos (126) e em heterozigose no outro paciente, em que foi associada a um segundo evento de mutação somática (106)). A presença da mesma variante causando fenótipos opostos (diabetes e hiperinsulinismo) já foi relatada em 2 pacientes de uma coorte francesa de MODY-*ABCC8* (103). Futuros estudos são necessários para melhor elucidação da associação desta variante no gene *KCNJ11* com o fenótipo de MODY.

Os 42 casos (53%) com suspeita de MODY que ainda permaneceram sem etiologia genética esclarecida após o SLE podem estar relacionados a alterações moleculares que não foram investigadas neste estudo, como: variantes em regiões regulatórias ou intrônicas; grandes deleções ou duplicações (CNV: *copy number variation*); ou podem estar associados a outros genes que não faziam parte do painel. Outra possibilidade é que dentre esses casos sem diagnóstico molecular, podem haver pacientes inicialmente com suspeita clínica de MODY, mas que na verdade apresentam outro tipo de DM (devido à sobreposição de características clínicas com DM tipo 1 e 2).

O uso do SLE para diagnóstico de MODY mostrou-se vantajoso para detecção de casos falso-negativos por Sanger (evitando erros de leitura ou não amplificação por *allele dropout*) e, também, para identificação de variantes em genes não suspeitados inicialmente ou não avaliados em exame de rotina.

6- CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

- 1- O painel de SLE utilizado neste estudo permitiu a análise simultânea dos 14 genes associados a MODY e também dos genes relacionados a diabetes neonatal, permitindo a detecção de variantes em genes que não são habitualmente estudados no exame genético de rotina.
- 2- A avaliação das variantes identificadas por SLE conforme os critérios propostos pela ACMG favoreceu uma interpretação mais rigorosa dos achados genéticos. Foram detectadas 16 variantes patogênicas / provavelmente patogênicas, confirmando o diagnóstico molecular de MODY em 20% dos casos com análise genética prévia negativa.
- 3- O SLE ampliou o número de casos confirmados de MODY e contribuiu para a redução do número de casos de MODY X no Brasil.
- 4- O painel de SLE possibilitou a detecção de variantes novas em 2 genes conhecidos de MODY: *HNF4A* e *NEUROD1*. E ainda permitiu a identificação de variantes alélicas em novos genes, previamente associados apenas a diabetes neonatal (1 variante patogênica no gene *NEUROG3* e 4 variantes de significado incerto nos genes *RFX6*, *GLIS3*, *CP* e *SLC19A2*). O papel dessas variantes como causadoras de MODY ainda permanece desconhecido e são necessários mais estudos para comprovação dessa nova associação.
- 5- Os casos avaliados neste estudo apresentavam características clínico-laboratoriais típicas de MODY, muitas vezes sem particularidades marcantes que permitissem distinguir o subtipo. Os critérios clínico-laboratoriais se mostraram úteis para diferenciação do tipo de diabetes

(MODY x DM 1 x DM 2), porém, não foram precisos para determinação do subtipo de MODY.

- 6- A detecção de casos com variantes patogênicas em genes de MODY considerados raros foi importante para expandir a casuística desses subtipos, porém, diante do pequeno número de casos e da grande variabilidade fenotípica mesmo intrafamiliar, torna-se difícil estabelecer um quadro clínico-laboratorial típico. Também não foi possível inferir um padrão de resposta terapêutica ou predição prognóstica dos casos associados a formas raras de MODY. Sendo assim, é de fundamental importância que se realizem mais estudos por SLE, para que seja possível uma melhor caracterização desses casos.

Com base nas conclusões acima descritas, a técnica de diagnóstico genético-molecular por SLE se mostrou promissora para esclarecimento das bases genéticas do diabetes tipo MODY. A ampliação do conhecimento sobre os genes relacionados à função e ao desenvolvimento da célula beta pancreática pode contribuir para o maior entendimento de doenças mais prevalentes e complexas, como o diabetes mellitus do tipo 2.

7- ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“Determinação da Base
Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico”**

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

O senhor está sendo convidado a participar de forma voluntária de um

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

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

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

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

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

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

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou

tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o senhor tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

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

Assinatura do paciente/ representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

ANEXO B – Formulário Eletrônico de MODY

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)

***Obrigatório**

- Nome completo do paciente *
- Sexo *
- Registro HCFMUSP (se disponível)
- Telefone de contato do paciente
- Cidade e Estado de nascimento *
- Data do nascimento *

- Médico solicitante *
- Telefone de contato do médico solicitante
- CRM do médico solicitante *
- E-mail de contato do médico solicitante *
- Local do serviço de origem *

- Suspeita Clínica * - Tipo de MODY

- Idade atual *
- Idade ao diagnóstico de diabetes ou pré-diabetes *
- Peso ao nascimento
- Peso ao diagnóstico *
- IMC atual *

- Associações clínicas *: Hipertensão arterial sistêmica / Dislipidemia / Obesidade central / Acanthose nigricans / Hipoacusia; surdez

- Quadro clínico do diabetes:
 - Sintomas relacionados a hiperglicemia ao diagnóstico *
 - Sintomático ao diagnóstico:
 - Quadro clínico*:
 - Poliúria; polifagia; polidipsia, Perda de peso, Cetoacidose

- Assintomático:
- O que motivou o diagnóstico de diabetes? *
 - Exame de rotina
 - Doença intercorrente (ex: infecção urinária; infecção respiratória...)
 - Exame com glicosúria (urina 1)
 - Diagnóstico de diabetes na família
 - Diabetes gestacional
- Tratamento do diabetes
 - Tratamento na época do diagnóstico de diabetes *
 - No caso de tratamento medicamentoso, informar o tempo entre a idade do diagnóstico e o início do tratamento
 - Duração do tratamento previamente descrito *
 - Tratamento atual do diabetes *
- Antecedente Familiar
 - História familiar de diabetes? *
 - Número de familiares com diabetes ou pré-diabetes (pré-DM) *
 - Pais com DM / pré-DM? *
 - Avós com DM / pré-DM? *
 - Outros parentes diabéticos
- Dados laboratoriais ao diagnóstico de diabetes
 - Glicemia de jejum * (mg/dL)
 - Insulinemia de jejum (μU/mL)
 - Peptídeo C de jejum (ng/mL) / Peptídeo C pós-prandial (ng/mL)
 - Hemoglobina glicada (HbA1c) * (%)
 - Glicosúria (urina 1) e glicemia concomitante (se disponível)
 - Teste de tolerância oral à glicose: Glicemia basal (0 minutos) (mg/dL); Glicemia aos 120 minutos (mg/dL)
 - Anticorpo anti-GAD
 - Anticorpo anti-tirosina fosfatase (IA2)
 - Anticorpo anti-insulina (IAA)
 - Proteína C reativa (PCR)
- Resposta ao tratamento
 - Houve melhora do controle glicêmico após início do tratamento? *
 - Valor de HbA1c (%) no início do tratamento *
 - Valor mínimo de HbA1c (%) após o tratamento *
 - Tempo necessário de tratamento para redução da HbA1c *

- Dados laboratoriais de seguimento
 - Variação da glicemia de jejum (mínima e máxima) * (mg/dL)
 - Variação de insulinemia de jejum (mínima e máxima) (μU/mL)
 - Variação de peptídeo C de jejum (mínimo e máximo) (ng/mL)
 - Variação de HbA1c (mínima e máxima) * (%)
 - Peptídeo C de jejum APÓS 3 ANOS do diagnóstico (se disponível) (ng/mL)
 - Glicemia de jejum (mg/dL) (concomitante à dosagem do peptídeo C)
 - HbA1c (%) (concomitante à dosagem do peptídeo C)
- Complicações do diabetes:
 - Retinopatia diabética
 - Nefropatia diabética
 - Neuropatia diabética
 - Complicações macrovasculares: Doença arterial coronariana / Acidente vascular cerebral / Doença arterial periférica
- Outros exames complementares
 - Perfil Lipídico * (mg/dL)
 - Ácido úrico (mg/dL)
 - Creatinina* (mg/dL) Uréia (mg/dL)
 - Perfil hepático: TGO/AST * (U/L) ; TGP/ALT * (U/L) ; FA (Fosfatase Alcalina) (U/L) ; Gama-GT (U/L)
 - Ultrassonografia abdominal (Nódulos hepáticos / Cistos renais / Outra alteração)
- Alterações extra-pancreáticas
 - Alterações renais:
 - Múltiplos cistos renais
 - Hipoplasia renal
 - Dilatação pielocalicial não obstrutiva
 - Doença glomerulocística
 - Em caso de disfunção renal informar a relação temporal com o diagnóstico de diabetes
 - Anomalias do trato genital:
 - Útero bicornio
 - Cisto de epidídimo / Hipospádia / Atresia de ducto deferente

ANEXO C – Critérios da ACMG para classificação da patogenicidade das variantes alélicas

Critério muito forte de patogenicidade

- PVS1** *Null variant*: variantes *nonsense*, *frameshift*, em sítios de *splice* canônicos ± 1 ou 2, códon de iniciação, deleção de 1 ou vários éxons, em um gene no qual perda de função (*LoF*) é um mecanismo conhecido de doença

Critérios fortes de patogenicidade

- PS1** Troca de aminoácido já estabelecida como patogênica, independente da troca do nucleotídeo
- PS2** Variante *de novo* em um paciente com doença sem história familiar (com paternidade confirmada)
- PS3** Presença de estudos funcionais (*in vitro* ou *in vivo*) bem estabelecidos de suporte do efeito deletério sobre o gene ou sua proteína
- PS4** A prevalência da variante nos indivíduos afetados é significativamente maior quando comparada com a prevalência em controles

Critérios moderados de patogenicidade

- PM1** Variante localizada em uma região *hotspot* para mutações e/ou no domínio funcional bem estabelecido da proteína, sem variantes descritas como benignas
- PM2** Variante ausente nos bancos de dados populacionais (*1000Genomes*, *ExAC*) (ou presente em frequência extremamente baixa, para os casos recessivos)
- PM3** Variante detectada em *trans* com uma variante patogênica para as doenças recessivas
- PM4** Modificação no tamanho da proteína causada por deleções ou inserções *in-frame* em região não repetitiva ou por variantes que perdem o códon de parada (tipo *stop-loss*)
- PM5** Nova variante *missense* em um aminoácido em que uma variante *missense* diferente já foi estabelecida como patogênica
- PM6** Variante considerada *de novo*, sem confirmação da paternidade

Critérios de suporte de patogenicidade

- PP1** Cosegregação da variante com a doença em múltiplos familiares afetados, em um gene conhecido como causador da doença
- PP2** Variante *missense* em um gene com uma baixa taxa de variantes *missense* benignas e no qual esse tipo de variante é considerado um mecanismo comum de doença
- PP3** Várias ferramentas computacionais suportam a evidência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no *splicing*, etc)
- PP4** O fenótipo do paciente ou a história familiar são bastante específicos de uma doença monogênica
- PP5** Variante recém-publicada como patogênica, porém o laboratório não apresenta condições de fazer um estudo funcional independente.

continua

ANEXO C (conclusão) – Critérios da ACMG para classificação da patogenicidade das variantes alélicas

Critério benigno independente	
BA1	Frequência alélica maior que 5% nos bancos de dados populacionais (<i>1000Genomes</i> , ESP, ExAC)
Critérios fortes de benignidade	
BS1	A frequência do alelo é maior que a esperada para a doença
BS2	Variante em homozigose (para doença recessiva), em heterozigose (para doença dominante) ou em hemizigose (para doença ligada ao X), com penetrância completa esperada em idade precoce, observada em indivíduo adulto saudável
BS3	Presença de estudos funcionais (<i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>) bem estabelecidos mostrando ausência de efeito deletério sobre a proteína ou <i>splicing</i>
BS4	Ausência de segregação em membros afetados da família
Critérios de suporte de benignidade	
BP1	Variante <i>missense</i> em um gene no qual variantes com perda de função (<i>LoF</i>) são mecanismos conhecidos de doença
BP2	Variante detectada em <i>trans</i> com uma variante patogênica para um gene dominante com penetrância completa ou observada em <i>cis</i> com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança
BP3	Deleções ou inserções <i>in-frame</i> em região repetitiva sem função conhecida
BP4	Várias ferramentas computacionais sugerindo ausência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no <i>splicing</i> etc)
BP5	Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para doença
BP6	Variante recém-publicada como benigna, porém o laboratório não apresenta condições de realizar um estudo funcional independente
BP7	Variante sinônima (silenciosa) cujas ferramentas de predição de <i>splicing</i> não predizem impacto na sequência consenso de <i>splice</i> nem a criação de um novo sítio de <i>splice</i> , e o nucleotídeo não é altamente conservado

Fonte: Adaptado de Richards e colaboradores, 2015.

LoF (loss of function): perda de função; *1000Genomes*: *1000Genomes Project*; *ExAC*: *Exome Aggregation Consortium*.

ANEXO D – Combinação dos critérios da ACMG para classificação das variantes alélicas

Classificação	Combinação dos critérios
Variante patogênica	(I) 1 critério muito forte de patogenicidade (PVS1) e (a) ≥ 1 critério forte de patogenicidade (PS1-PS4) ou (b) ≥ 2 critérios moderados de patogenicidade (PM1-PM6) ou (c) 1 critério moderado de patogenicidade (PM1-PM6) e 1 critério de suporte de patogenicidade (PP1-PP5) ou (d) ≥ 2 critérios de suporte de patogenicidade (PP1-PP5) ou (II) ≥ 2 critérios fortes de patogenicidade (PS1-PS4) ou (III) 1 critério forte de patogenicidade (PS1-PS4) e (a) ≥ 3 critérios moderados de patogenicidade (PM1-PM6) ou (b) 2 critérios moderados de patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 2 critérios de suporte de patogenicidade (PP1-PP5) ou (c) 1 critério moderado de patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 4 critérios de suporte de patogenicidade (PP1-PP5)
Variante provavelmente patogênica	(I) 1 critério muito forte de patogenicidade (PVS1) e 1 critério moderado de patogenicidade (PM1-PM6) ou (II) 1 critério forte de patogenicidade (PS1-PS4) e 1 ou 2 critérios moderados de patogenicidade (PM1-PM6) ou (III) 1 critério forte de patogenicidade (PS1-PS4) e ≥ 2 critérios de suporte de patogenicidade (PP1-PP5) ou (IV) ≥ 3 critérios moderados de patogenicidade (PM1-PM6) ou (V) 2 critérios moderados de patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 2 critérios de suporte de patogenicidade (PP1-PP5) ou (VI) 1 critério moderado de patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 4 critérios de suporte de patogenicidade (PP1-PP5)
Variante benigna	(I) 1 critério benigno independente (BA1) ou (II) ≥ 2 critérios fortes de benignidade (BS1-BS4)
Variante provavelmente benigna	(I) 1 critério forte de benignidade (BS1-BS4) e 1 critério de suporte de benignidade (BP1-BP7) ou (II) ≥ 2 critérios de suporte de benignidade (BP1-BP7)
Variante de significado incerto	(I) outra combinação de critérios não mencionada acima ou (II) critérios contraditórios de benignidade e de patogenicidade

Fonte: Adaptado de *Richards* e colaboradores, 2015

8- REFERÊNCIAS

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2017 Jan;40(Suppl 1):S11-S24.
2. Diabetes Report Card 2012. Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services, 2012.
3. Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Saúde. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Sociedade Brasileira de Diabetes, 2017.
4. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014 Jan;37 Suppl 1:S81-90.
5. Fajans SS, Bell GI. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care*. 2011 Aug;34(8):1878-1884.
6. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia*. 2012 May;55(5):1265-1272.
7. Stekelenburg CM, Schwitzgebel VM. Genetic defects of the beta-cell that cause diabetes. *Endocr Dev*. 2016;31:179-202.
8. Fajans SS, Conn JW. Tolbutamide-induced improvement in carbohydrate tolerance of young people with mild diabetes mellitus. *Diabetes*. 1960 Mar-Apr;9:83-88.
9. 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.
10. Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, 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):4807-4812.
11. Bowman P, Flanagan SE, Edghill EL, et al. Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. *Diabetologia*. 2012 Jan;55(1):123-127.
12. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, et al. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PLoS One*. 2012;7(6):e37423.
13. Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A, et al. Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus. *Am J Hum Genet*. 2015 Jul 2;97(1):177-185.
14. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011 Jul 2;378(9785):31-40.

15. IDF Diabetes Atlas 7th edition 2015. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>.
16. Naylor R, Philipson LH. Who should have genetic testing for maturity-onset diabetes of the young? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Oct;75(4):422-426.
17. 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):2504-2508.
18. Velho G, Robert JJ. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): genetic and clinical characteristics. *Horm Res*. 2002;57 Suppl 1:29-33.
19. 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):971-980.
20. Vaxillaire M, Froguel P. Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2008 May;29(3):254-264.
21. McDonald TJ, Colclough K, Brown R, et al. Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2011 Sep;28(9):1028-1033.
22. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, et al. Beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes*. 2001 Feb;50 Suppl 1:S94-100.
23. Chevre JC, Hani EH, Boutin P, et al. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia*. 1998 Sep;41(9):1017-1023.
24. Shepherd M, Ellis I, Ahmad AM, et al. Predictive genetic testing in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med*. 2001 May;18(5):417-421.
25. Hattersley A, Bruining J, Shield J, Njolstad P, Donaghue KC. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2009 Compendium. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2009 Sep;10 Suppl 12:33-42.
26. Althari S, Gloyn AL. When is it MODY? Challenges in the Interpretation of Sequence Variants in MODY Genes. *Rev Diabet Stud*. 2015;12(3-4):330-348.
27. Caetano LA, Santana LS, Costa-Riquetto AD, et al. PDX1-MODY and dorsal pancreatic agenesis: New phenotype of a rare disease. *Clin Genet*. 2017 Apr 24 [Epub ahead of print].
28. Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, et al. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Oct;98(10):4055-4062.

29. 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):669-685.
30. Kaisaki PJ, Menzel S, Lindner T, 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):528-535.
31. Timsit J, Bellanne-Chantelot C, Dubois-Laforgue D, Velho G. Diagnosis and management of maturity-onset diabetes of the young. *Treat Endocrinol.* 2005;4(1):9-18.
32. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(4):200-213.
33. Stride A, Vaxillaire M, Tuomi T, et al. The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia.* 2002 Mar;45(3):427-435.
34. Menzel R, Kaisaki PJ, Rjasanowski I, Heinke P, Kerner W, Menzel S. A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) gene. *Diabet Med.* 1998 Oct;15(10):816-820.
35. McDonald TJ, Shields BM, Lawry J, et al. High-sensitivity CRP discriminates HNF1A-MODY from other subtypes of diabetes. *Diabetes Care.* 2011 Aug;34(8):1860-1862.
36. Shepherd M, Shields B, Ellard S, Rubio-Cabezas O, Hattersley AT. A genetic diagnosis of HNF1A diabetes alters treatment and improves glycaemic control in the majority of insulin-treated patients. *Diabet Med.* 2009 Apr;26(4):437-441.
37. Schober E, Rami B, Grabert M, et al. Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: experience from a large multicentre database. *Diabet Med.* 2009 May;26(5):466-473.
38. Estalella I, Rica I, Perez de Nanclares G, 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):538-546.
39. Massa O, Meschi F, Cuesta-Munoz A, et al. High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. Diabetes Study Group of the Italian Society of Paediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP). *Diabetologia.* 2001 Jul;44(7):898-905.
40. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, 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):1512-1526.

41. Colom C, Corcoy R. Maturity onset diabetes of the young and pregnancy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug;24(4):605-615.
42. Ellard S, Bellanne-Chantelot C, Hattersley AT, European Molecular Genetics Quality Network Mg. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia.* 2008 Apr;51(4):546-553.
43. Steele AM, Wensley KJ, Shields BM, et al. Microvascular complication risk in patients with 50 years of moderate hyperglycaemia: are target ranges for glycaemic control appropriate? [Abstract]. *Diabet Med.* 2011;28(Suppl. 1):28.
44. Hattersley AT, Pearson ER. Minireview: pharmacogenetics and beyond: the interaction of therapeutic response, beta-cell physiology, and genetics in diabetes. *Endocrinology.* 2006 Jun;147(6):2657-2663.
45. Faguer S, Decramer S, Chassaing N, et al. Diagnosis, management, and prognosis of HNF1B nephropathy in adulthood. *Kidney Int.* 2011 Oct;80(7):768-776.
46. Bellanne-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, et al. Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med.* 2004 Apr 6;140(7):510-517.
47. Bellanne-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D, 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):3126-3132.
48. Heidet L, Decramer S, Pawtowski A, et al. Spectrum of HNF1B mutations in a large cohort of patients who harbor renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Jun;5(6):1079-1090.
49. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet.* 1997;17(2):138-139.
50. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 1999 Nov;23(3):323-328.
51. Raeder H, Johansson S, Holm PI, et al. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet.* 2006 Jan;38(1):54-62.
52. Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawee N, et al. PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jul;92(7):2821-2826.
53. Edghill EL, Flanagan SE, Patch AM, 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;57(4):1034-1042.

54. Borowiec M, Liew CW, Thompson R, 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):14460-14465.
55. Schwitzgebel VM. Many faces of monogenic diabetes. *J Diabetes Investig*. 2014 Mar 23;5(2):121-133.
56. Owen K, Thanabalasingham G, Juszczak A. Rare causes of MODY. Diapedia [Internet]. 2014; 41040851263 rev. no. 17. Available from: <https://doi.org/10.14496/dia.41040851263.17>.
57. Anik A, Catli G, Abaci A, Bober E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015 Mar;28(3-4):251-263.
58. Shepherd M, Sparkes AC, Hattersley AT. Genetic testing in maturity onset diabetes of the young (MODY): a new challenge for the diabetic clinic. *Practical Diabetes Int*. 2001;18(1):16-21.
59. Frayling TM, Lindgren CM, Chevre JC, et al. A genome-wide scan in families with maturity-onset diabetes of the young: evidence for further genetic heterogeneity. *Diabetes*. 2003 Mar;52(3):872-881.
60. Moises RS, Reis AF, Morel V, 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;24(4):786-788.
61. Furuzawa GK, Giuffrida FM, Oliveira CS, Chacra AR, Dib SA, Reis AF. Low prevalence of MODY2 and MODY3 mutations in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Sep;81(3):e12-14.
62. Maraschin JF, Kannengiesser C, Murussi N, et al. HNF1alpha mutations are present in half of clinically defined MODY patients in South-Brazilian individuals. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Nov;52(8):1326-1331.
63. Caetano LA, Jorge AA, Malaquias AC, et al. Incidental mild hyperglycemia in children: two MODY 2 families identified in Brazilian subjects. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012 Nov;56(8):519-524.
64. DellaManna T, Silva MR, Chacra AR, 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):490-495.
65. Giuffrida FM, Calliari LE, Manna TD, 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 Feb 19.
66. Mota AJ, Bruggemann S, Costa FF. MODY 2: mutation identification and molecular ancestry in a Brazilian family. *Gene*. 2013 Jan 10;512(2):486-491.
67. Weinert LS, Silveiro SP, Giuffrida FM, et al. Three unreported glucokinase (GCK) missense mutations detected in the screening of thirty-two Brazilian kindreds for GCK and HNF1A-MODY. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Nov;106(2):e44-48.

68. Giuffrida FMA, Weinert LS, Moises RCS, et al. Clinical and molecular update of a large cohort followed by the Brazilian MODY multicenter study group (BRASMODY). *Diabetol Metab Syndr*. 2015;7(Suppl 1):A212.
69. Giuffrida FMA, Moises RS, Weinert LS, 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 Research and Clinical Practice*. 2016.
70. 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):441-448.
71. Colclough K, Saint-Martin C, Timsit J, Ellard S, Bellanne-Chantelot C. Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *Eur J Hum Genet*. 2014 Sep;22(9).
72. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):376-380.
73. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012.
74. Anderson MW, Schrijver I. Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine. *Genes*. 2010;1(1):38-69.
75. Ellard S, Lango Allen H, De Franco E, et al. Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing. *Diabetologia*. 2013 Sep;56(9):1958-1963.
76. Alkorta-Aranburu G, Carmody D, Cheng YW, 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;113(4):315-320.
77. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, et al. Highly sensitive diagnosis of 43 monogenic forms of diabetes or obesity through one-step PCR-based enrichment in combination with next-generation sequencing. *Diabetes Care*. 2014 Feb;37(2):460-467.
78. Johansson S, Irgens H, Chudasama KK, et al. Exome sequencing and genetic testing for MODY. *PLoS One*. 2012;7(5):e38050.
79. Dusatkova P, Fang M, Pruhova S, et al. Lessons from whole-exome sequencing in MODYX families. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Jun;104(3):e72-74.
80. Eilbeck K, Quinlan A, Yandell M. Settling the score: variant prioritization and Mendelian disease. *Nat Rev Genet*. 2017 Oct;18(10):599-612.
81. Li Q, Liu X, Gibbs RA, Boerwinkle E, Polychronakos C, Qu HQ. Gene-specific function prediction for non-synonymous mutations in monogenic diabetes genes. *PLoS One*. 2014;9(8):e104452.
82. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of

Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.

83. Molven A, Njolstad PR. Role of molecular genetics in transforming diagnosis of diabetes mellitus. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011 Apr;11(3):313-320.

84. Vaxillaire M, Bonnefond A, Froguel P. The lessons of early-onset monogenic diabetes for the understanding of diabetes pathogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012 Apr;26(2):171-187.

85. Thanabalasingham G, Pal A, Selwood MP, 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):1206-1212.

86. Doria A, Yang Y, Malecki M, 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):253-261.

87. 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):60-64.

88. Besser RE, Shepherd MH, McDonald TJ, et al. Urinary C-peptide creatinine ratio is a practical outpatient tool for identifying hepatocyte nuclear factor 1-alpha/hepatocyte nuclear factor 4-alpha maturity-onset diabetes of the young from long-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Feb;34(2):286-291.

89. Santana LS, Caetano LA, Costa-Riquetto AD, et al. Clinical application of ACMG-AMP guidelines in HNF1A and GCK variants in a cohort of MODY families. *Clin Genet*. 2017 Oct;92(4):388-396.

90. Carroll RW, Murphy R. Monogenic diabetes: a diagnostic algorithm for clinicians. *Genes*. 2013 Sep 26;4(4):522-535.

91. Grupo de Diabetes Monogênico USP (São Paulo). Formulário eletrônico - MODY 2014 [Acesso em 10 out 2017]. [<https://goo.gl/xxTjI4>]. Available from: <http://www.diabetesgeneticousp.com/>.

92. 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.

93. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. 2012 May;30(5):434-439.

94. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46.

95. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet*. 2016 Jun 02;98(6):1077-1081.

96. Matthijs G, Souche E, Alders M, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2016 Oct;24(10):1515.

97. Ziemssen F, Bellanne-Chantelot C, Osterhoff M, Schatz H, Pfeiffer AF. Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia* 42: 121-123. *Diabetologia*. 2002 Feb;45(2):286-287.
98. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, et al. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993 Mar 11;328(10):697-702.
99. Thomson KL, Gloyn AL, Colclough K, 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 Nov;22(5):417.
100. Garcia-Herrero CM, Galan M, Vincent O, et al. Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia*. 2007 Feb;50(2):325-333.
101. Lorini R, Klersy C, d'Annunzio G, 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):1864-1866.
102. Bellanne-Chantelot C, Carette C, Riveline JP, 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;57(2):503-508.
103. Riveline JP, Rousseau E, Reznik Y, et al. Clinical and metabolic features of adult-onset diabetes caused by ABCC8 mutations. *Diabetes Care*. 2012 Feb;35(2):248-251.
104. Shimajiri Y, Sanke T, Furuta H, et al. A missense mutation of Pax4 gene (R121W) is associated with type 2 diabetes in Japanese. *Diabetes*. 2001 Dec;50(12):2864-2869.
105. Rubio-Cabezas O, Jensen JN, Hodgson MJ, et al. Permanent Neonatal Diabetes and Enteric Anendocrinosis Associated With Biallelic Mutations in NEUROG3. *Diabetes*. 2011 Apr;60(4):1349-1353.
106. Mohnike K, Wieland I, Barthlen W, et al. Clinical and genetic evaluation of patients with KATP channel mutations from the German registry for congenital hyperinsulinism. *Horm Res Paediatr*. 2014;81(3):156-168.
107. Meur G, Simon A, Harun N, et al. Insulin gene mutations resulting in early-onset diabetes: marked differences in clinical presentation, metabolic status, and pathogenic effect through endoplasmic reticulum retention. *Diabetes*. 2010 Mar;59(3):653-661.
108. Flanagan SE, Clauin S, Bellanne-Chantelot C, et al. Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K(ATP) channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat*. 2009 Feb;30(2):170-180.
109. Malecki MT, Yang Y, Antonellis A, Curtis S, Warram JH, Krolewski AS. Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4alpha gene among families with early onset Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1999 Mar;16(3):193-200.

110. Edghill EL, Bingham C, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J Med Genet.* 2006 Jan;43(1):84-90.
111. Patel KA, Kettunen J, Laakso M, et al. Heterozygous RFX6 protein truncating variants are associated with MODY with reduced penetrance. *Nat Commun.* 2017 Oct 12;8(1):888.
112. Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, et al. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol.* 2009;10(3):R32.
113. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature.* 2014 Apr 24;508(7497):469-476.
114. Szopa M, Ludwig-Galezowska A, Radkowski P, et al. Genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing in patients with maturity-onset diabetes of the young. *Pol Arch Med Wewn.* 2015;125(11):845-851.
115. Pezzilli S, Ludovico O, Biagini T, et al. Insights from Molecular Characterization of Adult Patients of Families with Multigenerational Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 2017 Oct 09.
116. Flannick J, Beer NL, Bick AG, et al. Assessing the phenotypic effects in the general population of rare variants in genes for a dominant Mendelian form of diabetes. *Nat Genet.* 2013 Nov;45(11):1380-1385.
117. Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, et al. Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest.* 1998 May 15;101(10):2215-2222.
118. Servitja JM, Ferrer J. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia.* 2004 Apr;47(4):597-613.
119. Steele AM, Tribble ND, Caswell R, et al. The previously reported T342P GCK missense variant is not a pathogenic mutation causing MODY. *Diabetologia.* 2011 Aug;54(8):2202-2205.
120. Bonnefond A, Yengo L, Philippe J, et al. Reassessment of the putative role of BLK-p.A71T loss-of-function mutation in MODY and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2013 Mar;56(3):492-496.
121. Beijers HJ, Losekoot M, Odink RJ, Bravenboer B. Hepatocyte nuclear factor (HNF)1A and HNF4A substitution occurring simultaneously in a family with maturity-onset diabetes of the young. *Diabet Med.* 2009 Nov;26(11):1172-1174.
122. Forlani G, Zucchini S, Di Rocco A, et al. Double heterozygous mutations involving both HNF1A/MODY3 and HNF4A/MODY1 genes: a case report. *Diabetes Care.* 2010 Nov;33(11):2336-2338.
123. Shankar RK, Ellard S, Standiford D, et al. Digenic heterozygous HNF1A and HNF4A mutations in two siblings with childhood-onset diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2013 Nov;14(7):535-538.

124. Jo W, Endo M, Ishizu K, Nakamura A, Tajima T. A novel PAX4 mutation in a Japanese patient with maturity-onset diabetes of the young. *Tohoku J Exp Med.* 2011;223(2):113-118.
125. Sujjitjoon J, Kooptiwut S, Chongjaroen N, Tangjittipokin W, Plengvidhya N, Yenchitsomanus PT. Aberrant mRNA splicing of paired box 4 (PAX4) IVS7-1G>A mutation causing maturity-onset diabetes of the young, type 9. *Acta Diabetol.* 2016 Apr;53(2):205-216.
126. Melikyan M, Kareva M, Petraykina E, et al. Genotype-phenotype associations in children with congenital hyperinsulinism. *Horm Res Paediatr.* 2012;78(suppl 1):216.

APÊNDICE

Received: 31 January 2017 | Revised: 19 April 2017 | Accepted: 21 April 2017
DOI: 10.1111/cge.13044

WILEY CLINICAL GENETICS

SHORT REPORT

PDX1-MODY and dorsal pancreatic agenesis: New phenotype of a rare disease

L.A. Caetano^{1,2} | L.S. Santana¹ | A.D. Costa-Riquetto^{1,2} | A.M. Lerario^{1,3} | M. Nery² | G.F. Nogueira⁴ | C.D. Ortega⁴ | M.S. Rocha⁵ | A.A.L. Jorge¹ | M.G. Teles^{1,2}

¹Monogenic Diabetes Group, Genetic Endocrinology Unit/LIM25, School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

²Diabetes Unit, Clinics Hospital, School of Medicine/USP, São Paulo, Brazil

³Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan

⁴Institute of Radiology, Clinics Hospital, School of Medicine/USP, São Paulo, Brazil

⁵Department of Radiology and Oncology, School of Medicine/USP, São Paulo, Brazil

Correspondence

Milena Gurgel Teles, MD, PhD, Av. Dr. Arnaldo, 455, sala 5340, 01246-903, São Paulo, Brazil. Email: milena.teles@usp.br

Funding Information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant/Award numbers: #2013/19920-2, #2013/02162-8; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant/Award number: #304678/2012-0.

Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) type 4 or PDX1-MODY is a rare form of monogenic diabetes caused by heterozygous variants in *PDX1*. Pancreatic developmental anomalies related to *PDX1* are reported only in neonatal diabetes cases. Here, we describe dorsal pancreatic agenesis in 2 patients with PDX1-MODY. The proband presented with diabetes since 14 years of age and maintained regular glycemic control with low doses of basal insulin and detectable C-peptide levels after 38 years with diabetes. A diagnosis of MODY was suspected. Targeted next-generation sequencing identified a heterozygous variant in *PDX1*: c.188delC/p.Pro63Argfs*60. Computed tomography revealed caudal pancreatic agenesis. Low fecal elastase indicated exocrine insufficiency. His son had impaired glucose tolerance, presented similar pancreatic agenesis, and harbored the same allelic variant. The unusual presentation in this Brazilian family enabled expansion upon a rare disease phenotype, demonstrating the possibility of detecting pancreatic malformation even in cases of PDX1-related diabetes diagnosed after the first year of life. This finding can improve the management of MODY4 patients, leading to precocious investigation of pancreatic dysgenesis and exocrine dysfunction.

KEYWORDS

dorsal pancreatic agenesis, heterozygous variant, MODY, PDX1

1 | INTRODUCTION

PDX1-MODY (MODY4) is a rare subtype of monogenic diabetes caused by heterozygous variants in *PDX1* (OMIM *600733), which encodes a transcription factor crucial for regulating pancreatic function and development.¹

Pancreatic agenesis related to *PDX1* is reported only in cases of neonatal diabetes mellitus (NDM), caused by homozygous or heterozygous compound variants.^{2–6} To date, there is no description of this pancreatic developmental anomaly associated with heterozygous *PDX1* variants (MODY4).³

Here, we describe the unprecedented association between PDX1-MODY and dorsal pancreatic agenesis (DPA) in 2 cases from a Brazilian family.

2 | RESEARCH DESIGN AND METHODS

The proband was selected for molecular analysis of MODY since he met the clinical criteria (age of diabetes onset < 35 years, family history of diabetes, absence of obesity, negative pancreatic antibodies and detectable C-peptide levels 3 to 5 years after diabetes diagnosis).⁷

We designed a customized next-generation sequencing (NGS) panel (SureSelect assay; Agilent Technologies, Santa Clara, California), which included 51 nuclear genes and the mitochondrial genome, all associated with different types of monogenic diabetes (see Appendix S1, Supporting information). Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, California). The pathogenicity of variants was evaluated according to American College of