

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

PEDRO CAMPOS FRANCO

**Reanálise fenotípica e genotípica de indivíduos com
diagnóstico clínico de diabetes monogênico sem etiologia
molecular estabelecida**

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2023

PEDRO CAMPOS FRANCO

**Reanálise fenotípica e genotípica de indivíduos com
diagnóstico clínico de diabetes monogênico sem etiologia
molecular estabelecida**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Milena Gurgel Teles Bezerra

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão
original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Franco, Pedro Campos

Reanálise fenotípica e genotípica de indivíduos com diagnóstico clínico de diabetes monogênico sem etiologia molecular estabelecida / Pedro Campos Franco. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Milena Gurgel Teles Bezerra.

Descritores: 1. Sequenciamento de nucleotídeo em larga escala 2. Genética médica 3. Medicina molecular 4. Diabetes mellitus tipo 2 5. Lipodistrofia parcial familiar

USP/FM/DBD-446/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À Berenice e Milton, por embasarem a construção deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, e para o meu crescimento pessoal e profissional ao longo dessa jornada.

Primeiramente, quero dedicar minha gratidão à Dra. Milena Gurgel Teles Bezerra. Sua orientação e amizade foram essenciais não apenas para a conclusão deste trabalho, mas também para o meu crescimento como indivíduo e profissional.

Quero estender meus agradecimentos a toda a equipe do Laboratório de Investigação Médica 25 (Unidade de Endocrinologia Genética), em especial a Elis, Eliete, Geni e Graça, pelo convívio e colaboração diária ao longo desses anos.

Ao Professor Alexander Augusto de Lima Jorge, agradeço pelas oportunidades, pela amizade e pelas conversas que foram fontes de grande inspiração e aprendizado.

Agradeço também aos meus colegas do Grupo de Diabetes Monogênico, Aline, Lucas, Ana Elisa e Augusto, pela confiança, convívio e amizade.

Aos pacientes e médicos colaboradores do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como dos inúmeros hospitais-escola, centros universitários, clínicas e consultórios médicos que contribuíram para a construção desta coorte de estudo, meu profundo agradecimento.

Às Professoras Berenice Bilharinho de Mendonça e Ana Cláudia Latrônico Xavier, agradeço pelas oportunidades, colaborações e pelo suporte institucional sempre oferecido.

À Secretaria de Pós-Graduação da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e especialmente à secretária Maria Aparecida (Cida) por toda a ajuda e disposição constantes, meu sincero agradecimento.

À Universidade de São Paulo, instituição pública de excelência em ensino e pesquisa e casa de grandes acadêmicos e mentores, agradeço o ambiente propício à construção do conhecimento e formação de recursos humanos.

Quero expressar minha gratidão aos meus pais e família, pela construção e manutenção das estruturas que possibilitaram minha jornada e crescimento.

Agradeço imensamente ao meu grande amor, Humberto Chaloub, pelos conselhos, carinho, compreensão e apoio incondicional que tornaram a conclusão desta jornada ainda mais especial.

Por fim, mas não menos relevante, quero expressar minha sincera gratidão a Charles Darwin. Não apenas pela contribuição inestimável de seu notável conhecimento científico produzido, que tornou possível o estudo da genética moderna, mas principalmente por seu livro "A Origem das Espécies". Nesta obra, através de uma narrativa minuciosa e detalhada, ele mostra a importância da pesquisa como um processo respeitosamente lento, persistente e, muitas vezes, uma jornada de toda uma vida. Indicando assim um caminho possível de gerar produção científica relevante com o potencial de melhorar não apenas a vida de nossa espécie humana, mas também a de todas as outras no reino animal, vegetal e fúngico com as quais devemos compartilhar harmoniosamente o nosso único lar, o planeta Terra.

EPÍGRAFE

“Logo, não há, entre as coisas singulares,
nada que seja mais útil ao homem
do que um homem.”

(Ética – Spinoza)

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho possui apoio financeiro da agência fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio do seguinte fomento:

- Programa Cota Institucional (Demanda Social) / Bolsas / No País / Doutorado Direto / Fluxo Contínuo 2020.

RESUMO

Franco PC. Reanálise fenotípica e genotípica de indivíduos com diagnóstico clínico de diabetes monogênico sem etiologia molecular estabelecida [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O diabetes *mellitus* (DM) corresponde a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. O DM monogênico compreende um grupo heterogêneo de fenótipos caracterizados, em última análise, por hiperglicemia, causada por uma única alteração genética patogênica. Dependendo do tipo de defeito molecular, o DM nesses indivíduos pode ocorrer devido à produção prejudicada de insulina, dificuldade na sinalização da insulina e/ou adiposopatia. O espectro fenotípico varia desde fenótipos não síndrômicos com insulinoopenia ao nascimento (DM neonatal) ou na primeira infância/idade adulta (*maturity-onset diabetes of the young* – MODY), passando por indivíduos com extrema resistência insulínica por doença do tecido adiposo (lipodistrofia parcial familiar), até indivíduos com fenótipos síndrômicos, como síndrome de Wolfram (WS) e DM mitocondrial. Juntos representam cerca de 1 a 2% de todos os casos de DM. Apesar de o diagnóstico molecular apropriado ser fundamental para adequado manejo clínico, aconselhamento genético e diagnóstico precoce do probando e dos familiares sob risco, um alto percentual de indivíduos suspeitos clinicamente ainda não possui etiologia molecular estabelecida. Os dados da literatura relativos ao percentual de casos não resolvidos são mais robustos no MODY e no DM neonatal, variando em torno de 50-80% e 30-37%, respectivamente. Esses valores são semelhantes em nossa coorte brasileira de DM monogênico. Desde 2019, o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) recomenda a reanálise periódica de dados genômicos como uma ferramenta eficaz para aumentar a capacidade diagnóstica de indivíduos com suspeita de doença genética. De acordo com isso, o presente estudo teve como objetivo aumentar a capacidade de diagnóstico molecular, executando uma reanálise fenotípica e genotípica combinada e bidirecional de uma coorte de 128 indivíduos com suspeita de DM monogênico (25 para MODY-GCK, 67 para MODY- não GCK, 12 para DM neonatal, 16 para lipodistrofia parcial familiar, 1 para WS e 7 para DM mitocondrial) sem diagnósticos moleculares estabelecidos após estudo molecular por sequenciamento paralelo de larga escala em um painel composto por 51 genes nucleares relacionados a DM monogênico mais o genoma mitocondrial completo. O amplo processo de reanálise aumentou o diagnóstico molecular de 9 a 26%. As reanálises fenotípicas, e portanto, a fenotipagem profunda, contribuíram pela exclusão de 62 (48,4%) casos atípicos. A reanálise genética contribuiu, adicionando 5 novos defeitos moleculares: duas mutações em regiões regulatórias (uma mutação de ponto em heterozigose no promotor do *HNF1A* e outra em homozigose em região *enhancer* do *PTF1A*); uma mutação de ponto em heteroplasmia no gene mitocondrial *MTTK*; uma missense em homozigose no *MFN2* e uma missense em heterozigose no *GCK*. Nossos achados sugerem que a reanálise genotípica e fenotípica combinada é uma estratégia eficaz, capaz de aumentar a acurácia diagnóstica molecular de indivíduos com suspeita de diabetes monogênico.

Palavras-chave: Sequenciamento de nucleotídeo em larga escala. Genética médica. Medicina molecular. Diabetes mellitus tipo 2. Lipodistrofia parcial familiar.

ABSTRACT

Franco PC. Phenotypic and genotypic reanalysis of individuals with a clinical diagnosis of monogenic diabetes without established molecular etiology [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, resulting from defects in insulin secretion and/or insulin action. Monogenic DM comprises a heterogeneous group of phenotypes characterized, ultimately, by hyperglycemia, caused by a single, pathogenic, genetic alteration. Depending on the type of molecular defect, DM in these individuals may occur because of impaired insulin production, difficulty in insulin signaling and/or adiposopathy. The phenotypic spectrum ranges from non-syndromic phenotypes with insulinopenia at birth (neonatal DM) or in early infancy/adulthood (maturity-onset diabetes of the young – MODY), going through individuals with extreme insulin resistance due to adipose tissue disease (familial partial lipodystrophy – FPLD), to individuals with syndromic phenotypes, such as Wolfram syndrome (WS) and mitochondrial DM. All together they represent around 1 to 2% of all cases of DM. Despite proper molecular diagnostic be essential for adequate clinical management, genetic counseling and early diagnosis of the proband and their family members at risk, a high percentage of clinically suspected individuals still do not have an established molecular etiology. Data in the literature regarding the percentage of unresolved cases are more robust in MODY and neonatal DM, varying around 50-80% and 20-37%, respectively. These figures are similar in our Brazilian monogenic DM cohort. Since 2019, the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) has recommended periodic genomic data reanalysis as an effective tool to increase the diagnostic capacity of individuals with suspected genetic disease. In line with that, the present study aimed to enhance the molecular diagnostic capacity by performing a combined and bidirectional phenotypic and genotypic reanalysis of a cohort of 128 individuals suspected of monogenic DM (25 for GCK-MODY, 67 for non GCK-MODY, 12 for neonatal DM, 16 for FPLD, 1 for WS and 7 for mitochondrial DM) without established molecular diagnoses after molecular study by target next generation sequence panel (tNGS) containing 51 nuclear genes related to monogenic DM and the whole mitochondrial genome. The broad reanalysis process increased molecular diagnostics from 9 to 26%. Phenotypical reanalysis, and therefore, deep phenotyping, contributed by excluding 62 (48.4%) of atypical cases. Genetic reanalysis contributed by adding 5 new overlooked molecular defects: two mutations in regulatory regions (one heterozygous point mutation in the *HNF1A* promoter and other homozygous in *PTF1A* enhancer); one point mutation in heteroplasmy in *MTTK* mitochondrial gene; one homozygous missense in *MFN2* and one heterozygous missense in *GCK*. Our findings suggest that the combined genotypic and phenotypic reanalysis is an effective strategy capable of increasing the molecular diagnostic accuracy of individuals with suspected monogenic diabetes.

Keywords: High-throughput nucleotide sequencing. Medical genetics. Molecular medicine. Diabetes mellitus type 2. Familial partial lipodystrophy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma de seleção de casos para reanálise	47
Figura 2 -	Linha do tempo de estudo molecular realizado nos pacientes com suspeita de DM monogênico	54
Figura 3 -	Fluxograma de priorização de variantes nucleares	60
Figura 4 -	Fluxo de priorização de variantes mitocondriais	63
Figura 5 -	Fluxograma do resumo dos resultados obtidos após reanálise combinada fenotípica e genotípica.....	68
Figura 6 -	Esquematização do impacto da positividade molecular após reanálise da coorte de indivíduos suspeitos para MODY-GCK....	70
Figura 7 -	Esquematização do impacto da positividade molecular após reanálise da coorte de indivíduos suspeitos para MODY- não GCK	70
Figura 8 -	Esquematização do impacto da positividade molecular após reanálise da coorte de indivíduos suspeitos para DMN	71
Figura 9 -	Esquematização do impacto da positividade molecular após reanálise da coorte de indivíduos suspeitos para LPD parcial familiar	71
Figura 10 -	Fluxograma de priorização fenotípica dos indivíduos com suspeita de MODY	73
Figura 11 -	Fluxograma de priorização fenotípica dos indivíduos com suspeita de LPD parcial familiar	76
Figura 12 -	Fluxograma de priorização fenotípica dos indivíduos com suspeita de DM neonatal	78
Figura 13 -	Primeira etapa de priorização de variantes nucleares	83
Figura 14 -	Fluxo de priorização de variantes nucleares intrônicas e sinônimas.....	84
Figura 15 -	Visualização pelo IGV da variante GCK(NM_000162.5):c.864-279_864-	85
Figura 16 -	Heredograma da família com variante intrônica c.864-279_864-271del no <i>GCK</i>	87

Figura 17 - Fluxo de priorização de variantes nucleares em regiões possivelmente regulatórias	88
Figura 18 - Visualização pelo IGV da variante Chr10:23508363A>G em homozigose em região <i>enhancer</i> do <i>PTF1A</i>	89
Figura 19 - Heredograma da família com a variante Chr10:23508363A>G região <i>enhancer</i> do <i>PTF1A</i>	90
Figura 20 - Visualização pelo IGV da variante <i>HNF1A</i> (NM_000545.6):c.-285C>T em heterozigose	91
Figura 21 - Heredograma da família com a variante c.-285C>T em região <i>upstream</i> do <i>HNF1A</i>	93
Figura 22 - Fluxo de priorização de variantes nucleares exônicas	94
Figura 23 - Visualização pelo IGV da variante <i>WFS1</i> (NM_006005.3):c.911T>C (p.Ile304Thr) em heterozigose	95
Figura 24 - Heredograma da família com a variante missense c.911T>C no <i>WFS1</i>	97
Figura 25 - Visualização pelo IGV da variante <i>CEL</i> (NM_001807.6):c.296A>C (p.Asp99Ala) em heterozigose	98
Figura 26 - Heredograma da família com a variante missense c.296A>C no <i>CEL</i>	101
Figura 27 - Visualização pelo IGV da variante <i>RFX6</i> (NM_173560.4): c.1494_1495insGGA (p.Lys498_Trp499insGly) em heterozigose	102
Figura 28 - Heredograma da família com a variante inserção <i>inframe</i> c.1494_1495insGGA no <i>RFX6</i>	103
Figura 29 - Visualização pelo IGV da variante mitocondrial m.8344A>G / tRNA (Lys).....	105
Figura 30 - Padrão de distribuição de gordura do probando 7.....	107
Figura 31 - Heredograma da família com a variante mitocondrial m.8344A>G no <i>MTTK</i>	108
Figura 32 - Visualização pelo IGV da variante no <i>GATA6</i> : Chr18:g.19780797_19780917del.....	109
Figura 33 - Heredograma da família com variante nuclear tipo CNV Chr18:g.19780797_19780917del no <i>GATA6</i>	112

Figura 34 - Heredograma da família com a variante nuclear missense c.17G>A no <i>INS</i>	115
Figura 35 - Heredograma da família com a variante nuclear missense c.664G>A no <i>PDX1</i>	117
Figura 36 - Heredograma da família com a variante nuclear missense c.1513 G>A no <i>HNF1A</i>	119
Figura 37 - Heredograma da família com a variante nuclear missense c.92G>A no <i>HNF1A</i>	121
Figura 38 - Visualização do eletroferograma do sequenciamento por Sanger da variante nuclear c.127C>A no <i>GCK</i>	122
Figura 39 - Heredograma da família com a variante nuclear c.127C>A no <i>GCK</i>	123
Figura 40 - Esquematização dos mecanismos pelos quais a reanálise fenotípica e genotípica combinada impacta na positividade em teste molecular	127
Figura 41 - Representação esquemática da proteína wolframina e localização das variantes já identificadas na literatura	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Subtipos de MODY e seus respectivos genes	29
Tabela 2 -	Características genético-moleculares e clínicas das principais causas de DMN	31
Tabela 3 -	Genes nucleares contemplados pelo painel do grupo Diabetes Monogênico FMUSP	53
Tabela 4 -	Descrição fenotípica da coorte com suspeita de MODY – GCK..	74
Tabela 5 -	Descrição fenotípica da coorte com suspeita de MODY - não GCK	75
Tabela 6 -	Descrição fenotípica da coorte com suspeita de LPD parcial familiar	77
Tabela 7 -	Descrição fenotípica dos indivíduos com suspeita de DM neonatal	79
Tabela 8 -	Descrição fenotípica dos indivíduos com DM Mitocondrial e Síndrome de Wolfram	80
Tabela 9 -	Resumo dos achados moleculares e seus respectivos fenótipos após reanálise genotípica.....	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>ABCC8</i>	Gene <i>ATP-Binding cassette, subfamily C, member 8</i>
<i>ABraOM</i>	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
<i>ACADVL</i>	Gene <i>ACYL-CoA dehydrogenase</i>
<i>ACMG</i>	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
<i>ADA</i>	<i>American Association of Diabetes</i>
<i>ADOs</i>	Antidiabéticos orais
<i>AF</i>	<i>Allele frequency</i>
<i>AGL</i>	Gene <i>Amylo-1,6-Glucosidase, 4-Alpha-Glucanotransferase</i>
<i>AGPAT2</i>	Gene <i>1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 2</i>
<i>AIRE</i>	Gene <i>Autoimmune regulator</i>
<i>AKT2</i>	Gene <i>AKT Serine/Threonine kinase 2</i>
<i>AMP</i>	<i>Association for Molecular Pathology</i>
<i>Anti-GAD</i>	Anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico
<i>Anti-IA2</i>	Anticorpo anti-tirosina fosfatase (<i>islet antigen 2</i>)
<i>Anti-IAA</i>	Anticorpo anti-insulina (<i>insulin autoantibody</i>)
<i>AntiTPO</i>	Anticorpo anti-tireoperoxidase
<i>AO</i>	Alelo observado
<i>ApoB</i>	Apolipoproteína-B
<i>APOGEE</i>	<i>pAthogenicity Prediction thrOUGH loGistic modEl trEe</i>
<i>APPL1</i>	Gene <i>Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain, and leucine zipper-containing protein 1</i>
<i>BLK</i>	Gene <i>BLK protooncogene, SRC family tyrosine kinase</i>
<i>BSCL2</i>	Gene <i>Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2</i>
<i>BWA</i>	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>

CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CAPPesq	Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa
CAVI	Gene <i>Caveolin 1</i>
CEL	Gene <i>Carboxil ester lipase</i>
CGH-array	<i>Comparative Genomic Hybridization-array</i>
CIDEC	Gene <i>Cell death-inducing DFFA-like effector c</i>
CISD2	Gene <i>CDGSH Iron sulfur domain protein 2</i>
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
ClCr	<i>Clearance de Creatinina</i>
ClinGen	<i>Clinical Genome Resource</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
CONTRA	<i>Copy Number Targeted Resequencing Analysis</i>
CP	Gene <i>Ceruloplasmin</i>
Cr	Creatinina
DEND	Síndrome de perturbação do desenvolvimento-epilepsia-diabetes neonatal
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DIDMOAD	Diabetes <i>insipidus</i> , diabetes <i>mellitus</i> , atrofia óptica e surdez neurossensorial
DLP	Dislipidemia
DM	Diabete <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DMN	Diabetes <i>mellitus</i> neonatal
DMNP	Diabetes <i>mellitus</i> neonatal permanente
DMNT	Diabetes <i>mellitus</i> neonatal transitório

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPM	Desenvolvimento neuropsicomotor
DP	Desvio padrão
DPP4	Enzima <i>dipeptidil dipeptidase 4</i>
Dx	Diagnóstico
DXA	<i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i>
EIF2AK3	Gene <i>Eukaryotic translation initiation factor 2-Alpha kinase 3</i>
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<i>FBP1</i>	Gene <i>Fructose-1,6-Bisphosphatase 1</i>
<i>FLNB</i>	Gene <i>Filamin, beta</i>
FMR	<i>Fat Mass Ratio</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<i>FOXP3</i>	Gene <i>Forkhead box P3</i>
<i>G6PC</i>	Gene <i>Glucose-6-Phosphatase, catalytic</i>
<i>GATA4</i>	Gene <i>Gata-Binding protein 4</i>
<i>GATA6</i>	Gene <i>Gata-Binding protein 6</i>
GCK	Gene <i>Glucokinase</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
<i>GLIS3</i>	Gene <i>GLIS family zinc finger protein 3</i>
<i>GLUD1</i>	Gene <i>Glutamate dehydrogenase 1</i>
GnomAD	<i>Genome Aggregation Database Hemoglobina</i>
GWAS	<i>Genome-wide association</i>
<i>GYS2</i>	Gene <i>Glycogen synthase 2</i>
<i>HADH</i>	Gene <i>3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica

HbA1c	Hemoglobina glicada
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HGMD	<i>The Human Gene Mutation Database</i>
<i>HMGA1</i>	Gene <i>High mobility group at-HOOK 1</i>
<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>HYMAI</i>	Gene <i>Hydatidiform mole-associated and imprinted transcript</i>
<i>IER3IP1</i>	Gene <i>Immediate-Early response 3-Interacting protein 1</i>
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
IMC	Índice de massa corporal
<i>INS</i>	Gene <i>Insulin</i>
<i>INSR</i>	Gene <i>Insulina Receptor</i>
IPEX	<i>Immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy, X-Linked</i>
<i>IRS1</i>	Gene <i>Insulin receptor substrate 1</i>
<i>IRS2</i>	Gene <i>Insulin receptor substrate 2</i>
ISPAD	<i>International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes</i>
K ATP	Potássio Adenosina Trifosfato
<i>KCNJ11</i>	Gene <i>Potassium channel, inwardly rectifying, subfamily J, member 11</i>
<i>KLF11</i>	Gene <i>Kruppel-Like factor 11</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LDP	Lipodistofia parcial
<i>LIPE</i>	Gene <i>Lipase, hormone-sensitive</i>
<i>LMNA</i>	Gene <i>LAMIN</i>

<i>LMNB2</i>	Gene <i>LAMIN B2</i>
LoF	<i>Loss of function</i>
LPD	Lipodistrofia
Lys	Lisina
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MAMs	<i>Mitochondrial associated endoplasmatic reticulum membranes</i>
MDEP	<i>Monogenic Diabetes Expert Panel</i>
MELAS	<i>Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes</i>
MERRF	<i>Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers</i>
MFN2	Mitofusina-2
MIDD	<i>Maternally Inherited Diabetes and Deafness</i>
MitoTIP	<i>Mitochondrial tRNA Informatics Predictor</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MMII	Membros inferiores
<i>MNX1</i>	Gene <i>Motor neuron and pancreas homeobox 1</i>
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the young</i>
MSeqDR	<i>Mitochondrial Disease Sequence Data Resource</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
<i>MTTK</i>	Gene <i>Transfer RNA, mitochondrial, lysine</i>
NA	Não aplicável
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
<i>NEUROD1</i>	Gene <i>Neurogenic differentiation 1</i>
<i>NEUROG3</i>	Gene <i>Neurogenin 3</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
<i>NKX2-2</i>	Gene <i>NK2 homeobox 2</i>

NRs	Não reagentes
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i>
ORFs	<i>Open reading frames</i>
OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation</i>
<i>PAX4</i>	Gene <i>Paired box gene 4</i>
<i>PAX6</i>	Gene <i>Paired box gene 6</i>
PC	Gene <i>Pyruvate carboxylase</i>
<i>PCK1</i>	Gene <i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PCYT1A</i>	Gene <i>Phosphate cytidylyltransferase 1, choline, alpha isoform</i>
<i>PDX1</i>	Gene <i>Pancreas/duodenum homeobox protein 1</i>
<i>PFT1A</i>	Gene <i>Pancreas transcription factor 1, alpha subunit</i>
PIG	Pequeno para idade gestacional
<i>PIK3R1</i>	Gene <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase, regulatory subunit 1</i>
<i>PLAGL1</i>	Gene <i>Plag1-like zinc finger 1</i>
<i>PLIN1</i>	Gene <i>Perilipin 1</i>
<i>POLD1</i>	Gene <i>Polymerase (DNA-Directed), delta 1, catalytic subunit</i>
<i>PPARG</i>	Gene <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
<i>PTF1A</i>	Gene <i>Pancreatic Transcription Factor 1, Alpha Subunit</i>
<i>PTRF</i>	Gene <i>Polymerase I and transcript release factor</i>
QE	Questionários eletrônicos
<i>RFX</i>	Gene <i>Regulatory factor X-Associated protein</i>
<i>RFX6</i>	Gene <i>Regulatory factor X-Associated protein - 6</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RNAs	Ácidos Ribonucleicos

RNAt	Ácido Ribonucleico transportador
SCLAC2A2	Gene <i>Solute carrier family 2 member 2</i>
SELA	Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala
SLC16A1	Gene <i>Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporter), member 1</i>
SLC19A2	Gene <i>Solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2</i>
SLC2A2	Gene <i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2</i>
SLC37A4	Gene <i>Solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4</i>
SLE	Sequenciamento em larga escala
SNVs	<i>Single nucleotide variants</i>
SOP	Síndrome dos ovários micropolicísticos
STAT3	Gene <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STST3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TG	Triglicérides
tNGS	<i>Target next generation sequence</i>
tRNA	RNA transportador
TTOG	Teste de tolerância oral a glicose
UCP2	Gene <i>Uncoupling protein 2</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
UTR3	<i>3`Untranslated region</i>
UTR5	<i>5`Untranslated region</i>
VCF	<i>Variant call format</i>
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>
VUS	<i>Variant of uncertain significance</i>
WES	<i>Whole exome sequencing</i>

WFS1 Gene *Wolframin ER transmembrane glycoprotein*

WGS *Whole genome sequencing*

WS *Wolfram Syndrome*

ZFP57 Gene *Zinc finger protein*

ZMPSTE24 Gene *Metalloproteinase STE24*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 MODY	27
1.1.1 Calculadora de MODY	29
1.2 Diabetes mellitus neonatal	30
1.3 Lipodistrofia parcial familiar	32
1.4 Causas genéticas raras em diabetes monogênico.....	33
1.4.1 Regiões regulatórias.....	33
1.4.2 Regiões intrônicas	34
1.4.3 DNA mitocondrial.....	35
1.4.4 Variantes sinônimas	36
1.4.5 Variações em número de cópias.....	37
1.4.6 Genes raros associados a MODY.....	38
1.4.6.1 <i>RFX6</i>	38
1.4.6.2 <i>WFS1</i>	38
1.5 Reanálise de dados de sequenciamento	39
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Geral	44
2.2 Específicos	44
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	45
3.1 Considerações éticas	46
3.2 Local da Pesquisa.....	46
3.3 Casuística	47
3.4 Critérios de seleção	49
3.5 Reanálise fenotípica.....	49
3.5.1 Priorização fenotípica	51
3.5.2 Análise estatística.....	51
3.6 Estudo genético molecular	52
3.7 Reanálise genotípica dos dados moleculares	54
3.7.1 Análise de bioinformática	54
3.7.2 Priorização dos achados moleculares.....	56
3.7.2.1 Genes nucleares candidatos.....	57

3.7.2.2	Priorização de variantes nucleares.....	57
3.7.2.3	Priorização de CNVs nucleares	61
3.7.2.4	Priorização de variantes mitocondriais.....	61
3.7.2.5	Priorização de CNVs mitocondriais	63
3.7.3	Reinterpretação de variantes de significado incerto	64
3.7.4	Confirmação e segregação familiar das variantes priorizadas	64
3.7.5	Classificação das variantes alélicas candidatas.....	65
4	RESULTADOS	67
4.1	Reanálise fenotípica e descrição clínica da coorte.....	72
4.1.1	Probandos com suspeita clínica de MODY	72
4.1.2	Probandos com suspeita clínica de LPD parcial familiar	76
4.1.3	Probandos com DM neonatal.....	78
4.1.4	Probandos com suspeita de DM mitocondrial e Síndrome de Wolfram.....	80
4.2	Reanálise genotípica e correlação genótipo/fenótipo.....	81
4.2.1	Priorização alélica de variantes nucleares.....	83
4.2.1.1	Variantes intrônicas e sinônimas	84
4.2.1.2	Variantes em regiões possivelmente regulatórias.....	88
4.2.1.3	Variantes exônicas.....	94
4.2.2	Priorização alélica de variantes mitocondriais.....	104
4.2.3	Priorização de variação do número de cópias nucleares mitocondriais	108
4.2.4	Variantes de significado incerto (VUS).....	113
4.2.5	Variantes detectadas de maneira extrínseca a nossa reanálise.....	122
5	DISCUSSÃO.....	125
5.1	Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com DM monogênico.....	126
5.1.1	Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com MODY- GCK.....	128
5.1.2	Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com MODY- não GCK.....	132
5.1.3	Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com DMN	135
5.1.4	Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com LDP parcial familiar.....	137
5.1.5	Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com DM mitocondrial	141

5.1.6 Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com Síndrome de Wolfram	142
5.2 Os novos achados moleculares provenientes da reanálise	144
5.2.1 Achados moleculares que explicaram o fenótipo	145
5.2.2 Achados moleculares pouco prováveis de explicarem o fenótipo ...	150
5.2.3 Reinterpretação de variantes do tipo VUS	161
5.2.4 Variantes extrínsecas à reanálise direta	163
6 CONCLUSÃO	165
7 ANEXOS	167
Anexo 1 - Critérios para seleção dos diversos fenótipos de DM monogênico utilizados por projetos anteriores	168
Anexo 2 - Genes nucleares contemplados pela primeira versão do painel	172
Anexo 3 - Genes nucleares contemplados pela segunda versão do painel	173
Anexo 4 - Metodologia utilizada no sequenciamento em larga escala (SLE) .	174
Anexo 5 - Genes nucleares contemplados pelo painel da disciplina de endocrinologia da FMUSP	177
Anexo 6 - Critérios da ACMG para classificação de patogenicidade das variantes alélicas	178
Anexo 7 - Diretriz para interpretação de variantes situadas nos genes GCK, HNF1A e HNF4A proposta pelo MDEP	180
Anexo 8 - Descrição fenotípica resumida dos indivíduos excluídos da reanálise	181
8 REFERÊNCIAS	182
9 APÊNDICES	219
Apêndice A – Plataforma Brasil – Parecer consubstanciado da Comissão de ética em pesquisa em seres humanos	220
Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	223
Apêndice C - Diabetes Res Clin Pract. 2022;187(April):109875	226

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) corresponde a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Em categorias gerais, pode ser dividido em: diabetes *mellitus* tipo 1 | DM1 (5%-10% dos casos no adulto), diabetes *mellitus* tipo 2 | DM2 (90%-95% dos casos), diabetes *mellitus* gestacional | DMG (1- 38% das gestações) ¹ e outros tipos raros de DM, dentre estes, o DM de origem monogênica ².

O diabetes monogênico resulta de um ou mais defeitos moleculares em um único gene. A doença pode apresentar um padrão de herança mendeliano (autossômica dominante-recessiva ou ligada ao X), não mendeliano (herança mitocondrial e epimutações) ou esporádico devido a uma variante *de novo* (não herdada). Até o momento, mais de 40 subtipos diferentes foram identificados, cada um com um fenótipo típico e um padrão específico de herança. Possui manifestação clínica com pouca ou nenhuma influência ambiental ³ e prevalência estimada de 3,6% entre os pacientes ≤ 30 anos diagnosticados com DM ⁴. Os seguintes subtipos são alguns exemplos deste fenótipo clínico e geneticamente heterogêneo: MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), Diabetes *Mellitus* Neonatal | DMN (transitório ou permanente), Diabetes *Mellitus* Mitocondrial, Lipodistrofia Genética e algumas síndromes genéticas que incluem DM como parte de sua apresentação clínica, como a Síndrome de Wolfram ⁵. Dentre estes, MODY é o fenótipo monogênico não sindrômico mais comum ⁶.

1.1 MODY

MODY é uma forma de DM não autoimune com padrão de herança autossômico dominante e elevada penetrância. Representa cerca de 1% a 2% ⁷⁻¹⁰ de todos os casos de DM. Os 11 subtipos já descritos (Tabela 1) geralmente se caracterizam por uma deficiência na secreção de insulina (disfunção de células β

pancreáticas), história familiar de DM, ausência de autoanticorpos contra ilhotas pancreáticas, não dependência de insulina após o período de “lua-de-mel” (de 3 a 5 anos) e início do quadro clínico na infância, adolescência ou adulto jovem (geralmente antes dos 25 anos de idade) ^{6,8,9}.

A confirmação do diagnóstico clínico de MODY por sequenciamento gênico ¹¹ e a consequente identificação de seu subtipo são fundamentais para um adequado manejo clínico, aconselhamento genético e diagnóstico precoce dos familiares sob risco ¹², já que alguns casos possuem peculiaridades quanto a tratamento e prognóstico ¹³. O método classicamente utilizado é o sequenciamento gênico bidirecional pelo método de Sanger ¹⁴ e, mais recentemente, o emprego das novas plataformas de sequenciamento paralelo em larga escala (painéis gênicos - tNGS / exomas) ^{11,15}. Por se tratar de uma doença heterogênea do ponto de vista clínico e genético, o painel genético é a abordagem mais utilizada atualmente por custo-efetividade ¹⁶.

A literatura aponta que em pacientes com DM não sindrômico, mais de 90% dos pacientes com MODY têm sua etiologia genética conhecida em variantes patogênicas nos genes dos fatores nucleares do hepatócito HNF1A, HNF4A e no da enzima glicoquinase (GCK) ^{17,18}.

Tabela 1 - Subtipos de MODY e seus respectivos genes

Gene	Subtipo	OMIM	Frequência	Características
<i>HNF4A</i>	MODY HNF4A	#125850	2%-10% ^{17,19}	macrossomia; hipoglicemia neonatal; HDL baixo; sensibilidade à sulfonilureia
<i>GCK</i>	MODY GCK	#125851	20%-63% ^{17,19,20}	hiperglicemia leve não progressiva; pequeno incremento no TTOG
<i>HNF1A</i>	MODY HNF1A	#600496	9%-72% ^{17,19-21}	baixo limiar renal de absorção de glicose; baixos níveis de PCR; HDL alto; sensibilidade à sulfonilureia
<i>PDX1</i>	MODY PDX1	#606392	<1% ¹⁹	disgenesia pancreática
<i>HNF1B</i>	MODY HNF1B	#137920	1%-6% ^{17,19}	disfunção renal; cistos renais; malformações urogenitais; alterações em eletrólitos, ácido úrico e enzimas hepáticas
<i>NEUROD1</i>	MODY NEUROD1	#606394	<1% ^{17,19}	pouco caracterizado
<i>CEL</i>	MODY CEL	#609812	Raro ²²	pouco caracterizado
<i>INS</i>	MODY INS	#613370	Raro ¹⁷	pouco caracterizado
<i>ABCC8</i>	MODY ABCC8	#125853	Raro ²³	sensibilidade à sulfonilureia
<i>KCNJ11</i>	MODY KCNJ11	#616329	Raro ²⁴	sensibilidade à sulfonilureia
<i>APPL1</i>	MODY APPL1	#616511	Raro ²⁵	pouco caracterizado

1.1.1 Calculadora de MODY

Além dos critérios classicamente definidos anteriormente, uma importante ferramenta - a *MODY probability calculator* - foi desenvolvida em 2012 para auxiliar o diagnóstico diferencial em pacientes com DM antes dos 35 anos²⁶. O algoritmo da calculadora se alimenta de dados clínicos laboratoriais para gerar uma pontuação ao indivíduo: quanto maior esta, maior a chance de se tratar de MODY. São diversos dados utilizados, dentre eles: idade, IMC e HbA1c ao diagnóstico de DM, tratamento, condições clínicas associadas, entre outros. Disponível na forma de aplicativo para *smartphones* (*Diabetes Diagnostics*), foi validado em população europeia caucasiana, sugerindo uma pontuação de 10% e 25% com sensibilidade e especificidade maior que 85% em diferenciar indivíduos com MODY daqueles com DM1 e DM2,

respectivamente. Em estudo para validação na coorte brasileira, um pontuação mais elevada de 60% na calculadora foi necessária para melhor discriminar esses subtipos de DM ²⁷.

1.2 DIABETES *MELLITUS* NEONATAL

O DMN corresponde à hiperglicemia diagnosticada até os 6 meses de vida. Em alguns casos pode ocorrer entre 6 meses a 12 meses, porém a grande maioria dos diagnósticos nessa faixa etária serão por diabetes tipo 1 ^{12,28}. Há incidência de um caso para cada 400.000-500.000 nascidos vivos ²⁹. Pode ser dividido em dois grandes grupos com proporções semelhantes: DMN permanente (DMNP) ou DMN transitório (DMNT) ^{6,12,29,30}. No DMNT ocorre remissão do diabetes nos primeiros meses de vida ³⁰, podendo haver reincidência em aproximadamente 50% dos casos, normalmente na infância tardia ou puberdade.

No DMNT, a maioria dos pacientes possui um defeito de metilação no cromossomo 6q24, resultando em aumento da expressão do gene *PLAGL1* ¹². A principal etiologia do DMNP, com mais de 22 genes associados, é a deficiência insulínica, decorrente de um comprometimento da função da célula beta pancreática ⁶. A maioria dos casos é decorrente de variantes ativadoras nos genes *KCNJ11*, *ABCC8* ^{31,32} e *INS*, responsáveis por 50%-75% dos casos de DMNP ³³⁻³⁵. Em alguns casos, podem estar presentes, sintomas neurológicos associados (atraso do desenvolvimento e epilepsia de início precoce) como naqueles ocasionados por modificações do canal de K ATP-dependente (genes *KCNJ11* e *ABCC8*) ^{31,32}.

A Tabela 2 ilustra os principais genes e padrões de herança associados a DMNP e DMNT ¹².

Tabela 2 - Características genético-moleculares e clínicas das principais causas de DMN

Gene	Fenótipo	Padrão de herança
Desenvolvimento pancreático anormal		
<i>PLAGL1</i>	DMNT (macroglossia/hérnia umbilical)	Variável (<i>imprinting</i>)
	DMNP (hipoplasia cerebelar/surdez)	Recessivo
<i>ZFP57</i>	DMNT (atraso do desenvolvimento/doença cardíaca)	Recessivo
	DMNP (microftalmia/malformações cerebrais)	Recessivo
<i>PDX1</i>	DMNP (agenesia pancreática)	Recessivo
<i>PTF1A</i>	DMNP (agenesia pancreática/displasia cerebelar)	Recessivo
	DMNP (malformações cardíacas congênicas)	Dominante
<i>RFX6</i>	DMNP (atresia intestinal/agenesia de vesícula biliar)	Recessivo
	DMNT (macroglossia/hérnia umbilical)	Recessivo
<i>GLIS3</i>	DMNP (hipotireoidismo congênito/cistos renais)	Recessivo
	DMNT (atraso do desenvolvimento/doença cardíaca)	Recessivo
<i>NEUROG3</i>	DMNP (enteropatia)	Recessivo
	DMNP (agenesia pancreática)	Recessivo
<i>NEUROD1</i>	DMNP (agenesia pancreática/displasia cerebelar)	Recessivo
<i>PAX6</i>	DMNP (atresia intestinal/agenesia de vesícula biliar)	Recessivo
<i>HNF1B</i>	DMNP (hipotireoidismo congênito/cistos renais)	Dominante
<i>GATA6</i>	DMNP (enteropatia)	Dominante
Anormalidades na função das células-β pancreáticas		
<i>GCK</i>	DMNP	Recessivo
<i>SLC2A2</i>	Síndrome de Fanconi-Bickel (DMNP)	Recessivo
<i>SLC19A2</i>	Síndrome de Roger (DMNP)	Recessivo
<i>ABCC8</i>	DMNT ou DMNP (Síndrome de DEND)	Dominante recessivo
<i>KCNJ11</i>	DMNT ou DMNP (Síndrome de DEND)	Dominante
Destruição das células-β pancreáticas		
<i>EIF2AK3</i>	Síndrome de Wolcott-Rallison (DMNP)	Recessivo
<i>IER3IP1</i>	DMNP (microcefalia/encefalopatia epiléptica)	Recessivo
<i>FOXP3</i>	Síndrome IPEX (DMNP)	Ligado ao X recessivo
<i>INS</i>	DMNP ou DMNT isolados	Dominante recessivo

1.3 LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILIAR

As síndromes de lipodistrofia (LPD) são frequentemente associadas a distúrbios hormonais e metabólicos, resultando em comorbidades graves que dependem do subtipo, extensão da perda de gordura, idade e sexo. Muitas das complicações observadas são secundárias à massa adiposa deficiente, resultando em armazenamento lipídico ectópico no fígado, músculo e em outros órgãos, além de ocasionar resistência insulínica. Esta resistência à insulina pode acarretar o desenvolvimento de DM, hipertrigliceridemia, síndrome do ovário policístico (SOP) e esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) ³⁶.

Dentro das lipodistrofias de causa genética, a lipodistrofia parcial familiar (LPD parcial familiar) possui uma herança, mais comumente, autossômica dominante, caracterizada por perda de gordura que afeta os membros, nádegas e quadris ³⁷. O acúmulo regional de excesso de gordura é frequente, variando de acordo com o subtipo e pode resultar em uma aparência cushingoide. A distribuição de gordura é habitualmente normal durante a primeira infância, com perda de gordura ocorrendo em torno da puberdade. A pseudo-hipertrofia muscular é comum. Complicações metabólicas são frequentes na idade adulta, assim como risco aumentado de doença cardíaca coronariana ³⁸ e, ocasionalmente, cardiomiopatia precoce.

Do ponto de vista de etiopatogenia genética, geralmente resultam de defeitos moleculares no gene da lamina (*LMNA*), que codifica a lamina A / C, uma proteína nuclear; ou mais raramente, de defeitos moleculares no *PPARG*, que codifica o receptor γ ativado por proliferador de peroxissomo, um fator de transcrição adipogênico ³⁹. Ambos os genes possuem função fundamental no desenvolvimento e manutenção do trofismo saudável do tecido adiposo.

1.4 CAUSAS GENÉTICAS RARAS EM DIABETES MONOGÊNICO

Desde a descoberta das principais causas de diabetes monogênico, muitos indivíduos ainda permanecem sem etiologia genética definida ^{8,10,19,40,41}.

Esforços têm sido realizados no intuito de aumentar a positividade do diagnóstico genético-molecular dessas casuísticas. Neste contexto, a valorização de achados moleculares em regiões não codificadoras e regulatórias ⁴²⁻⁴⁵, além daqueles em genes classicamente associados a fenótipos sindrômicos (*RFX6*, *WFS1* e a variante mitocondrial m.3243A>G) agora associados a MODY, se mostra promissora. Esta última abordagem segue o pensamento “expansão da síndrome” ⁴⁶, ou seja, uma vez identificada a base genética de uma síndrome, muitas apresentações clínicas mais leves ou incompletas são reconhecidas por compartilharem a mesma base genética molecular. Em MODY, 2 estudos de 2022 apontaram que em torno de 20% dos indivíduos tiveram sua hiperglicemia isolada explicada por defeitos moleculares classicamente associados a DM sindrômico ^{47,48}.

1.4.1 Regiões regulatórias

O processo de transcrição gênica depende de sequências de nucleotídeos chamadas de regiões regulatórias na fita de DNA. Essas sequências são responsáveis por fornecerem o sítio de ancoragem para os fatores de transcrição necessários para o adequado funcionamento da RNA polimerase. Dentre estas regiões, existem duas principais caracterizadas: promotoras e *enhancers*. As regiões promotoras são sequências curtas de DNA situadas intimamente próximas e em cis em relação ao gene (geralmente *upstream*) ou mesmo intragênicas. Já os *enhancers* são sequências de nucleotídeos distantes do gene em que influenciam a transcrição. Estas últimas podem se fixar tanto *upstream* quanto *downstream* e distantes até milhares de pares de base.

Apesar de esforços desde o ENCODE, em 2004 ⁴⁹, até projetos mais atuais ⁵⁰ para caracterizarem estas regiões regulatórias ao longo do genoma humano, muitas permanecem desconhecidas. Talvez pela complexidade e dificuldade técnica em identificar e classificar seus impactos funcionais ⁵¹, a análise destas regiões não é

rotineiramente efetuada durante investigações genéticas. Este fato ocorre mesmo a despeito dos resultados em estudos de GWAS (*genome-wide association*): mais de 88% de variantes associadas a doenças se situam em regiões não codificadoras ⁵².

Do ponto de vista de DM monogênico, a análise de regiões regulatórias tem se mostrado promissora ⁵³, como esperado. Variantes em região promotora já são descritas em genes mais comumente associados a MODY (*HNF1A* ^{45,54-56}, *GCK* ^{57,58}, *HNF4A* ^{45,59}). Variantes em regiões *enhancer* do *PTF1A* também já foram descritas associadas ao fenótipo de DMN não sindrômico ⁶⁰. Todas, em última análise, alteram a expressão gênica, diminuindo os respectivos produtos proteicos.

1.4.2 Regiões intrônicas

As regiões intrônicas dos genes constituem aproximadamente 23% do genoma humano ⁶¹. A literatura atual destaca que variações fora das *Open Reading Frames* (ORFs) podem afetar a expressão gênica ao alterar regiões promotoras, *enhancers*, sítios de ligação a micro RNAs e sinais de poliadenilação. Além disso, alterações em sítios de splicing podem comprometer o processamento do RNAm imaturo, gerando, por exemplo, a retenção de um íntron ou o descarte de um éxon na molécula madura ⁶².

Alterações em sítios de splicing têm sido reconhecidas como responsáveis por doenças monogênicas ⁶³⁻⁶⁸. Estima-se que entre 15% e 50% de todas as variantes patogênicas responsáveis por estes fenótipos alterem o processamento da molécula de RNAm ^{69,70}.

A utilização crescente de técnicas de sequenciamento paralelo em larga escala tem resultado em aumento expressivo do número de variantes alélicas, identificadas em regiões intrônicas profundas (mais de 100 pb das regiões fronteiriças íntron-éxon). *Genome Wide Association Studies* (GWAS) já identificaram diversas variantes localizadas em regiões intrônicas profundas como associadas a fenótipos clínicos complexos ^{70,71}. Em revisão recente realizada por Vaz-Drago et al. (2017) ⁷², foram analisados 117 estudos publicados entre 1983 e 2016 que descreveram, ao todo, 185 alterações patogênicas, em 77 genes, localizadas em regiões intrônicas a, pelo menos, 100 pb do sítio canônico de splicing mais próximo. Em DM monogênico, variantes

alélicas patogênicas em regiões intrônicas profundas (sítios não canônicos de splicing) já foram descritas nos genes *ABCC8*⁴⁴ e *INS*⁴³, além das clássicas já descritas em regiões fronteiriças íntron-éxon (sítios canônicos de splicing)^{42,45}.

1.4.3 DNA mitocondrial

A doença mitocondrial é um termo designado para um número cada vez maior de distúrbios clínicos e geneticamente heterogêneos, que abrigam um defeito no sistema de oxidação e fosforilação mitocondrial (OXPHOS). Isso ocorre como resultado de mutação no DNA mitocondrial (mtDNA) ou em genes no DNA nuclear responsáveis pela manutenção e reparo do mtDNA.

O acometimento de múltiplos sistemas é típico nas mitocondriopatias, podendo ser pouco evidente nos estágios iniciais da doença. O DM é característica comum da doença mitocondrial e raramente ocorre de forma isolada⁷³, sendo associado a outros fenótipos, como surdez (*Maternally Inherited Diabetes and Deafness* - MIDD), mais comumente⁷⁴.

A associação do mtDNA com DM foi descrita, inicialmente, há mais de 20 anos em famílias com um rearranjo (duplicação) no genoma mitocondrial ou com a variante pontual m.3243A>G^{75,76}, sendo esta última mais prevalente entre indivíduos com mitocondriopatia^{77,78}. Esta associação com DM possui plausibilidade biológica uma vez que tanto a secreção insulínica quanto sua ação nos tecidos dependem do adequado funcionamento mitocondrial^{79,80}.

A variante m.3243A>G exibe fenótipos clinicamente heterogêneos a depender de sua heteroplasmia. Enquanto a alta heteroplasmia, excedendo limiar crítico (>85%), causa encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios similares a um acidente vascular cerebral (MELAS); a baixa heteroplasmia (<45%) causa diabetes com ou sem surdez (MIDD). Entender como diferenças quantitativas na heteroplasmia do mtDNA produzem estados patológicos distintos permanecem em aberto. Em indivíduos com DM, já foram descritos níveis de heteroplasmia de 1% a 45% em leucócitos e de 10%-45% nas células β pancreáticas. Surpreendentemente, heteroplasmias de 0,01%–0,1% também foram associadas ao desenvolvimento de DM, indicando elevada penetrância desta variante⁸¹.

Ao sofrer influência de fatores ambientais, da heteroplasmia e do DNA nuclear, as mitocondriopatias apresentam grande variabilidade fenotípica. Tuppen et al., 2005⁸², em uma revisão sobre variantes patogênicas já descritas no genoma mitocondrial, alertaram para a hipótese de estas estarem associadas de maneira determinística e, ou predispondo a doenças comuns do envelhecimento, como DM, Alzheimer e Doença de Parkinson, independentemente da presença de manifestações clínicas sindrômicas.

1.4.4 Variantes sinônimas

Mutações sinônimas são geralmente consideradas não patogênicas, uma vez que não se espera que alterem a função da proteína. Este paradigma foi desafiado nos últimos anos, com evidências de que alterações na sequência de códons sinônimas podem ter consequências para a eficiência e rapidez da tradução por afetarem a estabilidade do RNA mensageiro⁸³ e a conformação da proteína⁸⁴. Além disso, outro possível mecanismo patogênico é o fato de poder gerar sítios de splicing aberrantes^{85,86}. Todos esses mecanismos, portanto, podem gerar consequências para a função da proteína⁸⁴.

Em diabetes monogênico, um estudo recente publicou uma variante patogênica sinônima como responsável pelo fenótipo de MODY-*GCK* em um paciente. Esta variante levou ao surgimento de um novo sítio de splicing na região codificadora do éxon 4⁸⁷ e consequente deleção de 24 pares de base, comprometendo o sítio de ligação da enzima GCK com a glicose⁸⁷. Em 2014, E. L. Igudin et al.⁸⁸ identificaram uma variante sinônima no éxon 6 do *GCK* criadora de um novo sítio doador de splicing. Esta variante resultou em um splicing aberrante com consequente deleção de 16 pares de base, o que alterou a expressão de seu RNA mensageiro em teste de expressão *in vitro* (minigene).

1.4.5 Variações em número de cópias

As CNVs (*copy number variation*) são definidas como rearranjos desbalanceados maiores que 50pb que aumentam ou diminuem o conteúdo do DNA⁸⁹, sendo classificadas como variação estrutural pelo *Database of Genomic Variants* (DGV)⁹⁰. Embora muitos fenótipos associados às CNVs sejam mediados pelo efeito de desbalanço na dosagem de genes, outras causas são possíveis, como a interrupção de uma sequência de codificação ou alteração da regulação transcricional⁶².

Métodos como o sequenciamento Sanger e o paralelo em larga escala (NGS) são capazes de identificar trocas únicas de nucleotídeos (SNVs) e pequenas inserções e deleções⁹¹. Tais abordagens, entretanto, não são em geral otimizadas para a detecção de CNVs⁹². Isso ocorre, pois o conteúdo gênico duplicado ou excluído contido em uma CNV é, em sua maioria, qualitativamente normal, não sendo o defeito quantitativo (dose do material gênico) evidenciado de forma fácil pelos métodos de sequenciamento.

Novos algoritmos em bioinformática têm sido capazes de fornecer a robustez necessária para avaliar a existência de CNVs, utilizando dados provenientes das novas plataformas de sequenciamento em larga escala e que empregam a característica de sobreposição dos pequenos fragmentos sequenciados que serão em seguida alinhados com a sequência referência do genoma⁹². O número total dos fragmentos reflete a quantidade de material gênico sequenciado, permitindo, a partir de sua contagem, perceber desvios na quantidade de dados genômicos esperados para a ploidia do genoma estudado. Essa abordagem foi aplicada com sucesso na detecção de CNVs no gene *GCK* em dois indivíduos não aparentados com suspeita clínica de MODY⁹³.

Do ponto de vista do genoma mitocondrial, CNVs são consideradas como causadoras de fenótipos sindrômicos com envolvimento multisistêmico, sendo DM isolado até então não relatado nestes casos⁹⁴.

1.4.6 Genes raros associados a MODY

1.4.6.1 *RFX6*

O fator de regulação 6 (*RFX6*) é considerado essencial para o desenvolvimento do pâncreas endócrino em camundongos, bem como em humanos ⁹⁵. O *RFX6* é responsável, em um modelo de herança recessivo, pela síndrome de Mitchell-Riley, caracterizada pela ausência de quaisquer ilhotas ou células produtoras de hormônios, atresia intestinal, hipoplasia da vesícula biliar e diarreia intratável ⁹⁶.

Em relação a MODY, variantes em heterozigose no gene *RFX6* foram inicialmente descritas como causadoras em 2017 por Patel et al. ⁹⁷. Este trabalho identificou duas variantes nonsense em heterozigose em dois probandos com diagnóstico clínico de MODY sem etiologia genética definida. A análise dos familiares dos probandos (totalizando 36 indivíduos) sugeriu que variantes em heterozigose no *RFX6* resultariam em MODY não sindrômico com baixa penetrância e de início pós-puberal.

Akiba et al. (2019) ⁹⁸ reportaram uma das variantes (p.Arg377Ter) previamente descritas por Patel et al. (2017) ⁹⁷, em uma família com grande variabilidade fenotípica de apresentação do DM: probando diagnosticado com MODY aos 10 anos de idade, mãe com hiperglicemia aos 26 anos, durante a gestação, e avó materna com hiperglicemia aos 50 anos em exames de rotina. Por fim, estudos em 2022 reforçaram que, até então, somente variantes do tipo nonsense no *RFX6* são causadoras de MODY em modelo de herança autossômico dominante ^{47,48}.

1.4.6.2 *WFS1*

Relaciona-se o gene que codifica a proteína wolfranina (*WFS1*) à Síndrome de Wolfram, a qual possui herança autossômica recessiva, clinicamente caracterizada por diabetes *insipidus*, diabetes *mellitus*, atrofia óptica e surdez neurosensorial (DIDMOAD) ⁷.

É crescente na literatura, entretanto, estudos que apontam variantes no *WFS1* em diversas zigosidades (homozigose, heterozigose e heterozigose composta) como

responsáveis por formas atípicas da Síndrome de Wolfram, cujos indivíduos possuem apenas algumas das características sindrômicas.

Na herança autossômica recessiva (homozigose/ heterozigose composta), algumas possibilidades de apresentação fenotípica não clássica têm sido descritas. Chausse et al.⁹⁹ ao realizarem análise genética de uma coorte francesa de 96 pacientes com desordens relacionadas ao *WFS1*, observaram que 13,8% dos pacientes apresentavam sintomas de início tardio (classificados no estudo como pacientes que desenvolveram DM e atrofia óptica após os 15 anos de idade) e identificaram dois irmãos com atrofia óptica isolada sem DM. Do ponto de vista de DM isolado, trabalhos mais recentes de 2022^{47,48} apontaram que variantes missenses neste padrão de herança explicaram uma proporção significativa dos casos de suspeitas de MODY.

Um padrão de herança autossômico dominante, por sua vez, corresponde ao que é denominado na literatura científica como Síndrome de Wolfram-Like¹⁰⁰, já descrita associada às mais diversas apresentações clínicas: surdez com atrofia óptica sem DM^{99,101}, surdez neurossensorial isolada¹⁰² e, mais raramente, DM isolado (MODY)¹⁰³.

1.5 REANÁLISE DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO

A maior difusão e o menor custo relacionados aos testes de diagnósticos genéticos (sequenciamento, *microarrays*, entre outros) resultaram em grande quantidade de dados para analisar¹⁰⁴. A classificação do alto número de variantes encontradas acaba por depender do conhecimento prévio de genes e suas associações com doença, assim como dados públicos revelados por laboratórios clínicos e outras fontes¹⁰⁵. Como era de se esperar, com o passar do tempo, a publicação desses dados e o conhecimento de novas associações gene-doença tornam a classificação de variantes um processo pouco estático. Para uma ideia de magnitude, um estudo feito por Wenger AM. et al.¹⁰⁶ mostrou que, no período entre 2004 e 2016: 1- Em média houve 266 novas associações genótipo-fenótipo catalogadas no OMIM. 2- Em torno de 9.210 variantes e 241 genes novos por ano foram registrados pelo HGMD. Ademais, do ponto de vista fenotípico, dois principais aspectos também são dinâmicos¹⁰⁷: 1- A

apresentação clínica do indivíduo evolui com o tempo, passando a apresentar novas características que podem ser cruciais na definição do caso; 2- O espectro fenotípico de uma doença pode se expandir à medida que outros indivíduos são identificados com genótipos específicos. Dessa forma, tanto do ponto de vista genotípico quanto fenotípico, o passar do tempo e a assimilação de novos conceitos a partir da vasta produção de conhecimentos recentes podem alterar a classificação de variantes ou mesmo valorizar e identificar outras não estimadas pelo processo investigativo.

A literatura aponta que muitas análises genômicas irão falhar em identificar uma alteração patogênica definitiva que explique suficientemente o fenótipo do indivíduo¹⁰⁸⁻¹¹¹, o que não é diferente nos casos de DM monogênico. Dessa forma, a subsequente reanálise desses dados tem se tornado opção crucial para acurácia diagnóstica¹¹². A maioria dos estudos de reanálise foram realizados em dados provenientes do sequenciamento genômico ou exômico completos; poucos focaram em painéis de genes. Dentre os mais relevantes descritos na literatura^{106, 113-124}, as estratégias abordadas variavam em torno de: 1- atualização de dados da literatura; 2- atualização do fenótipo; 3- atualização da diretriz usada para interpretação das variantes; 4- realização de estudos funcionais; 5- atualização das ferramentas de bioinformática; 6- atualização de estratégias de filtragem; 7- reclassificação de variantes; 8- estudos familiares de segregação; 9- novas associações gene/variante-doença; 10- análise de CNVs. É interessante notar que mesmo os trabalhos que usaram WGS como fonte de dados^{118,120} não avaliaram regiões intrônicas profundas, como possíveis causadoras a serem reanalisadas. Além disso, nenhum dos citados trabalhos, até o momento, observou o genoma mitocondrial de forma rotineira durante o processo de reanálise de fenótipos ainda não esclarecidos sob o ponto de vista etiológico genético. Estritamente, em relação às pesquisas que reanalisaram dados de painéis^{113,115,117}, os alvos foram: 1- novas associações gene-doença; 2- pesquisa de CNVs; 3- atualização da literatura; 4- atualização do fenótipo; 5- atualização de diretriz na interpretação da variante; 6- atualização da relação variante-doença.

A fim de ilustrar a magnitude do impacto que a reanálise pode gerar na capacidade diagnóstica, um didático trabalho escrito por Pengfei Liu et al.¹²⁴, publicado em 2019, na revista *New England Journal of Medicine*, pode ser destacado. A reanálise de dados de sequenciamento por WES em duas coortes,

predominantemente compostas por crianças com distúrbios do desenvolvimento neurológico, gerou um aumento na capacidade diagnóstica. Na primeira coorte de 250 indivíduos (sequenciadas entre 2011 e 2012, e reanalisadas em 2019), o percentual de casos esclarecidos subiu de 24,8% para 46,8% (um aumento de 88% no número de diagnosticados). Na segunda coorte de 2.000 indivíduos (sequenciadas entre 2012 e 2013 e reanalisadas em 2019), esse percentual subiu de 25,2% para 36,7% (um aumento de 45% nos casos esclarecidos).

Logo, passa a ser uma recomendação do Colégio Americano de Patologistas, a reanálise e a atualização dos dados genéticos obtidos por sequenciamento a cada dois anos ¹⁰⁷. A reanálise de dados de sequenciamento se mostra como um meio eficaz de otimizar o número de casos esclarecidos, sem necessidade de um custo adicional para novo sequenciamento com metodologias mais avançadas e abrangentes. Este método consegue contemplar tanto a fluidez fenotípica, muito informativa, apresentada pelos indivíduos ao longo do tempo, quanto a evolução do conhecimento científico do ponto de vista molecular e melhor entendimento dos diversos fenótipos.

Em relação a DM monogênico e reanálise de dados genéticos, um único estudo ¹²⁵ aponta o valor deste processo em indivíduos com MODY, DMN e hipoglicemia hiperinsulinêmica. Neste trabalho, os autores reanalisaram dados de sequenciamento por Sanger em seis genes (*HNF1A*, *GCK*, *HNF4A*, *ABCC8*, *KCNJ11* e *INS*) relacionados aos fenótipos mencionados. Esta reanálise aconteceu somente ao atualizar a classificação das variantes encontradas na literatura vigente. Em um curto espaço de quatro anos, de 99 variantes reportadas no início, 30 (em torno de 30%) foram reclassificadas. Destas, 11 sofreram um *upgrade* de significado incerto para patogênica ou provavelmente patogênica, aumentando o número de indivíduos com etiologia genética esclarecida em cerca de 10%.

Dessa forma, a reanálise se apresenta como um caminho possível a fim de aumentar a acurácia diagnóstica em uma coorte de indivíduos com DM monogênico, cujo defeito molecular nem sempre é identificado. Em MODY, a literatura mundial estima que entre 50 a 85% dos casos não são esclarecidos (MODY-X) ^{8,10,17,19,21,40,126-130}, semelhante a nossa casuística 50% ^{20,41}. Por se tratar de uma doença com peculiaridades clínicas, terapêuticas e prognósticas, um adequado diagnóstico é

essencial para o manejo destes pacientes ¹³¹. Em relação ao DMN, o percentual de indivíduos não esclarecidos gira em torno de 20% na literatura mundial ¹³², assim como em nossa coorte ²⁸. Talvez por serem fenótipos ainda mais raros, dados na literatura são escassos em relação à positividade molecular de indivíduos com suspeita de LPD parcial familiar, Síndrome de Wolfram e DM mitocondrial.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Aumentar a capacidade diagnóstica molecular em uma coorte de indivíduos com suspeita clínica de diabetes monogênico sem diagnóstico genético prévio.

2.2 ESPECÍFICOS

- Revisitar dados clínicos e acrescentar novas informações fenotípicas obtidas pelo seguimento;
- Revisitar dados obtidos por tNGS e investigar a presença de defeitos gênicos antes não avaliados em:
 - 1- Regiões intrônicas profundas, promotoras, variantes sinônimas raras e CNVs nos genes candidatos associados a cada um dos fenótipos (MODY, DMN, LPD).
 - 2- Regiões codificadoras e fronteiras éxon-íntron dos genes *RFX6*, *WFS1* em pacientes com suspeita clínica de MODY e DMN.
 - 3- Genoma mitocondrial completo.
- Atualizar a classificação de variantes de significado incerto.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos e as orientações contidas na declaração de Helsinki e pelos termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os pacientes aqui avaliados são oriundos de um protocolo de pesquisa denominado “Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico” (Apêndice A - Plataforma Brasil - Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - 01093912.8.0000.0068), aprovado pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (#70637) e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (2013/19920-2).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B) foi assinado por todos os pacientes, maiores de 18 anos, ou pelos pais ou tutores, quando menores de 18 anos, antes da realização de qualquer procedimento.

3.2 LOCAL DA PESQUISA

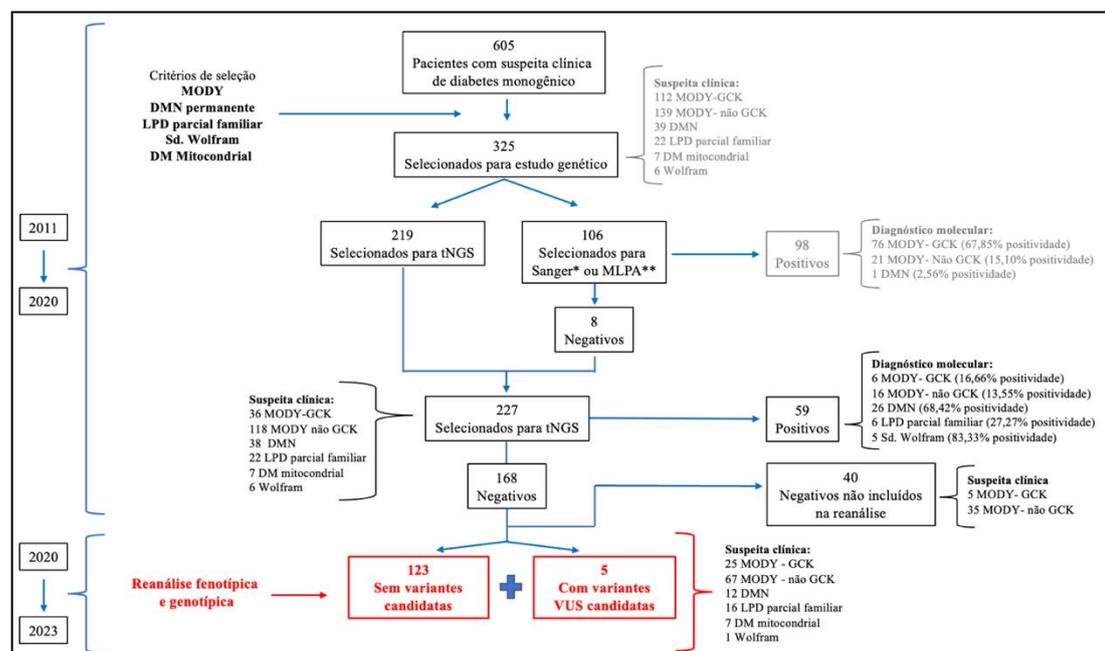
Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia Genética (Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular – LIM25) e na Unidade de Diabetes, ambas pertencentes à Disciplina de Endocrinologia da FMUSP.

Sua realização teve colaboração do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LIM 15) e do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da FMUSP.

3.3 CASUÍSTICA

Foram encaminhados ao Grupo de Diabetes Monogênico da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) 605 probandos com diagnóstico clínico-laboratorial sugestivo de MODY, DMN, Lipodistrofia parcial familiar, DM Mitocondrial ou Síndrome de Wolfram, por meio de transferências ambulatoriais internas ou por serviços externos, a partir de questionários eletrônicos (QE) (www.diabetesgeneticousp.com) entre 2011 e 2020 (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma de seleção de casos para reanálise



*Sanger (*GCK*, *HNFI1A* e *KCNJ11*)

** MLPA (*HNFI1B*)

HCFMUSP: hospital das clínicas da faculdade de medicina da universidade de são paulo; **MODY:** maturity onset diabetes of the young; **DMN:** diabetes mellitus neonatal; **LPD:** Lipodistrofia; **Sd. Wolfram:** síndrome de wolfram; **tNGS:** target next generation sequence

Como demonstra a Figura 1, os casos que preencheram os devidos critérios de seleção foram investigados do ponto de vista de etiologia molecular. De maneira resumida, esta investigação foi previamente realizada por projetos de pesquisa anteriores do grupo de Diabetes Monogênico da Universidade de São Paulo^{20, 28, 41, 133-135} da seguinte forma:

- 1- Estudo por Sanger dos genes *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B* e *KCNJ11* para os indivíduos com fenótipos suspeitos para MODY-GCK, MODY-HNF1A, MODY-HNF1B e DMN respectivamente;
- 2- Estudo por MLPA em indivíduos com fenótipos típicos de MODY-HNF1B;
- 3- Estudo por painel de genes (descrito na seção 3.6) relacionados a DM monogênico (análise de regiões codificadores e sítios canônicos de splicing) nos pacientes sem etiologia esclarecida pelas metodologias citadas acima; ou diretamente investigados por esta técnica por não apresentarem um subtipo de DM monogênico clássico em seu fenótipo.

Esta abordagem foi capaz de esclarecer a etiologia molecular de 157 indivíduos (96 através de Sanger, 2 MLPA e 59 através do tNGS), sendo 168 indivíduos sem diagnóstico genético e dentre esses, 128 indivíduos (123 sem variantes candidatas e 5 com variantes VUS), composto por 25 indivíduos com suspeita clínica de MODY-GCK, 67 de MODY-não GCK, 12 de DMN, 16 de LPD parcial familiar, 7 de DM mitocondrial e um com Síndrome de Wolfram. Esses foram a coorte da presente pesquisa. Essa coorte chega para a reanálise com os seguintes percentuais de positividade para diagnóstico molecular: 14,28% para MODY (16,66% para MODY – GCK e 13,35% para MODY - não GCK), 83,33% para síndrome de Wolfram, 27,27% para LPD parcial familiar e 68,42% para DMN). Ao todo, 40 indivíduos (5 com suspeita de MODY-GCK e 35 de MODY-não GCK) sem etiologia molecular estabelecida não foram incluídos no estudo de reanálise, pois em 2020 a análise dos dados moleculares não havia sido concluída.

Quando analisada de forma global, a positividade de toda essa investigação etiológica molecular (Sanger, MLPA e tNGS) entre 2011 e 2020, prévia ao atual estudo de reanálise, tem-se o seguinte índice de positividade para os diversos fenótipos: 47,41% para MODY (73,21% para MODY GCK, 26,61% MODY não

GCK); 69,23% para DM neonatal; 27,27% para LDP parcial familiar; 83,33% para Síndrome de Wolfram; 0% para DM mitocondrial. A Figura 1 também destaca o índice de positividade exclusivo da primeira etapa de investigação molecular composta pelo estudo do Sanger ou MLPA.

3.4 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Foram selecionados para reanálise todos os indivíduos com suspeita clínica de Diabetes Monogênico e com análise molecular prévia negativa após sequenciamento por painel gênico (TMPS). Os critérios de seleção para os diversos fenótipos de MODY, DM neonatal, LPDF e síndrome de Wolfram foram elaborados em projetos prévios do grupo ^{41,136,139} e se encontram resumidos no Anexo 1.

Os critérios clínico-laboratoriais utilizados para seleção de pacientes com suspeita de Diabetes Mitocondrial não avaliados em projetos prévios do grupo foram baseados na diretriz da *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes* (ISPAD) ⁷:

Critérios de inclusão

DM associado a uma ou mais das condições:

- Surdez neurossensorial;
- Oftalmoplegia externa progressiva.

3.5 REANÁLISE FENOTÍPICA DA CASUÍSTICA

Entendendo que os primeiros casos encaminhados para avaliação de nosso grupo datam de 2011, informações relevantes podem ser adquiridas com o seguimento destes indivíduos até o presente momento (ano de 2023).

A reanálise fenotípica contemplou tanto a revisão dos dados clínicos iniciais, que motivou o encaminhamento para o estudo molecular, quanto aqueles apresentados durante o seguimento. As novas informações são provenientes de:

- 1- pacientes que acompanhavam no HCFMUSP:
 - Análise de prontuário eletrônico.
- 2- pacientes que não acompanhavam no HCFMUSP:
 - Contato com médico assistente responsável (via e-mail, mensagens de texto ou ligação telefônica);
 - Contato com o paciente diretamente (via e-mail, mensagens de texto ou ligação telefônica).
- 3- Revisitação dos questionários eletrônicos de encaminhamento.

A partir dos novos dados clínicos obtidos, novas ações foram adotadas:

- 1- Solicitação de novos exames complementares (laboratoriais ou imagem);
- 2- Reconvocação para novas consultas (em modelo presencial ou teleconsulta) dos pacientes que perderam seguimento.

Os dados clínicos laboratoriais que fizeram parte desta busca foram:

- 1- Idade HbA1c (%), glicemia (mg/dL), IMC, estratificação do peso (baixo peso, eutrófico, sobrepeso ou obeso), comorbidades metabólicas (HAS, dislipidemia, esteatose hepática) e tratamento ao diagnóstico de DM e durante seguimento;
- 2- Tempo de seguimento entre suspeita clínica e realização do teste molecular;
- 3- Idade do início de DM nos familiares;
- 4- Presença de comorbidades metabólicas (HAS ou DLP ou obesidade) em familiares.

3.5.1 Priorização fenotípica

A caracterização fenotípica dos indivíduos com DM monogênico evoluiu com a progressão da literatura científica e, dessa forma, novas particularidades clínicas são identificadas em cada um de seus subtipos. De forma geral, os critérios para seleção de DM monogênico foram ficando mais restritos com o tempo. Em relação ao fenótipo de MODY, a descrição fenotípica¹³⁶ (Apêndice C) e validação da ferramenta *MODY calculator*²⁷ de nossa coorte permitiram identificar uma maior acurácia em se diagnosticar indivíduos com MODY em idades mais jovens (<30 anos) e pontuações mais elevadas no *MODY calculator* (>60%). Em paralelo, em relação ao fenótipo de LPD parcial familiar, o percentual de gordura em MMII reduzido (<25%)^{137,138} passou a ser condição indispensável na suspeita destes indivíduos. Por fim, a descrição de nossa coorte de DM neonatal permitiu identificar que a positividade do teste molecular ocorre majoritariamente em pacientes diagnosticados com DM nos primeiros seis meses de vida²⁸. Por outro lado, por se tratar de quadros sindrômicos, os fenótipos clássicos de Síndrome de Wolfram e DM Mitocondrial sofreram pouca atualização. Nestes casos, o avanço ocorreu no sentido de expansão fenotípica, uma vez que ocorreu, com mais frequência, a identificação desses defeitos moleculares em indivíduos com fenótipos que não contemplavam todos os critérios da síndrome^{47,48}.

Esta etapa de priorização visou identificar e priorizar os indivíduos que possuem essas características clínicas ditas determinantes na literatura contemporânea a este trabalho e até mesmo excluir da reanálise genotípica aqueles, cujo seguimento clínico permitiu tornar muito pouco provável a possibilidade de DM monogênico. Ao separar os indivíduos em fenótipos típicos e pouco típicos, esta etapa permitiu, também, apontar em qual dos dois grupos ocorreu maior chance de achados moleculares possivelmente causadores do fenótipo suspeito.

3.5.2 Análise estatística

Os indivíduos com suspeita clínica para MODY, por estarem em maior número, tiveram seus dados clínicos analisados do ponto de vista estatístico. Este com objetivo de determinar quais questões clínicas e/ou laboratoriais apresentavam diferença estatisticamente relevante entre os indivíduos típicos e pouco típicos.

Para os dados onde a variável resposta é numérica (idade ao diagnóstico, tempo de seguimento, HbA1c, glicemia ao diagnóstico e o *MODY calculator*), fizemos os testes de Shapiro-Wilk e o de Levene para testarmos os pressupostos de Normalidade e Homogeneidade de variâncias, respectivamente. No caso de os pressupostos terem sido atingidos, realizamos o teste T para comparar os grupos; quando os pressupostos não foram atingidos, realizamos o teste de Wilcoxon/Mann-Whitney. Para comparar estatisticamente as demais variáveis qualitativas, utilizamos o teste do Qui-Quadrado. Os resultados foram considerados significativos, caso atingissem um p-valor de 0.05 e todas as análises estatísticas foram feitas em ambiente R.

3.6 ESTUDO GENÉTICO MOLECULAR

Os dados brutos genéticos reanalisados foram obtidos a partir do sequenciamento de dois diferentes painéis gênicos customizados direcionado para regiões gênicas-alvo (*Target-NGS*).

Um deles, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa¹³⁴, possui duas versões, uma de 2014 e outra de 2015. Em ambas as versões, as regiões-alvo compreenderam todos os éxons dos genes selecionados, as regiões intrônicas flanqueadoras (25pb a montante e a jusante de cada éxon), regiões UTR3 e UTR5 e o genoma mitocondrial completo. Especificamente, em relação aos 13 genes classicamente associados a MODY, todas as regiões intrônicas foram contempladas pela cobertura. Em particular, a região *enhancer* do gene *PTF1A* (situada a 25.000 pares de base a distante do gene) foi sequenciada em ambas as versões dos painéis. As diferenças entre os painéis se encontram resumidas na Tabela 3 e foram duas: 1- Número de genes nucleares cobertos (46 genes na primeira versus 51 genes na segunda); 2- Sequenciamento de regiões promotoras (1000 pares de base a montante do códon de iniciação da transcrição gênica) dos genes relacionados a MODY que ocorreu somente na segunda versão do painel. A soma dos fragmentos-alvo da segunda versão do painel gênico foi de aproximadamente 488 kb. A metodologia com suas diversas etapas para obtenção destes dados moleculares se encontra resumidas no Anexo 4.

Tabela 3 - Genes nucleares contemplados pelo painel do grupo Diabetes Monogênico FMUSP

MODY	MODY e DM Neonatal		DM neonatal	
<i>HNF4A</i>	<i>GCK</i>	<i>PTF1A</i>	<i>GATA4</i>	<i>MNX1</i>
<i>HNF1A</i>	<i>PDX1</i>	<i>NEUROG3</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>PAX6</i>
<i>KLF11</i>	<i>HNF1B</i>	<i>RFX6</i>	<i>SLC19A2</i>	<i>SCLAC2A2</i>
<i>CEL</i>	<i>NEUROD1</i>	<i>ZFP57</i>	<i>CP</i>	
<i>PAX4</i>	<i>INS</i>	<i>GLIS3</i>	<i>PLAGL1</i>	
<i>BLK</i>	<i>ABCC8</i>	<i>IERIP1</i>	<i>HYMAI</i>	
<i>APPL1</i>	<i>KCNJ11</i>	<i>GATA6</i>	<i>NKX2-2</i>	
Diabetes autoimune	Lipodistrofias Genéticas		Síndrome Resistência Insulínica	
<i>FOXP3</i>	<i>AGPAT2</i>	<i>PLIN1</i>	<i>INSR</i>	
<i>AIRE</i>	<i>BSCL2</i>	<i>ZMPSTE24</i>		
<i>STST3</i>	<i>CAV1</i>	<i>AKT2</i>		
Síndrome de Wolfram	<i>PTRF</i>	<i>CIDEA</i>	Hipoglicemia Hiperinsulinêmica	
	<i>LMNA</i>	<i>TBC1D4</i>	<i>HADH</i>	<i>GLUD1</i>
<i>WFS1</i>	<i>CISD2</i>	<i>PPARG</i>	<i>SLC16A1</i>	

Genes sombreados: região intrônica completa contemplada.

Letra verde negrito: genes novos associados a MODY.

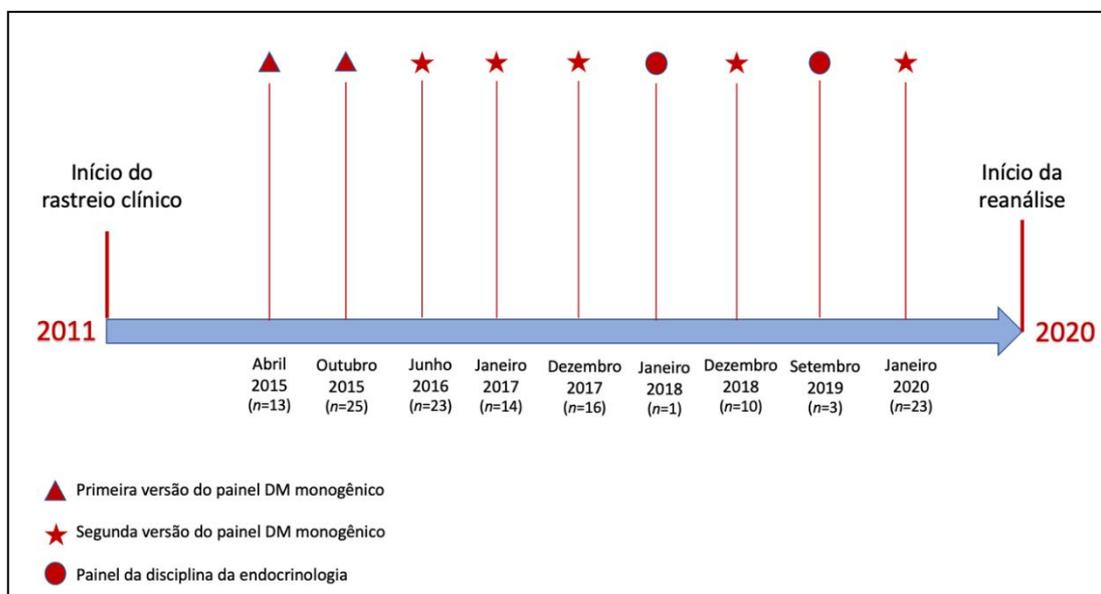
Letra azul negrito: genes novos adicionados à segunda versão do painel.

Letra vermelho negrito: genes excluídos como causadores de monogênicos.

O segundo painel, proveniente da disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da USP, contemplou os diversos genes não só relacionados a DM monogênico, mas também às demais enfermidades endócrinas. Neste caso somente as regiões exônicas foram alvo do sequenciamento. Especificamente em relação aos fenótipos de DM monogênico foram contemplados 68 genes nucleares (Anexo 5).

Entre o período de abril de 2015 a janeiro de 2020, como esquematizado pela Figura 2, 124 pacientes foram investigados pelo painel mais amplo do nosso grupo de pesquisa e quatro foram estudados pelo painel da disciplina.

Figura 2 – Linha do tempo de estudo molecular realizado nos pacientes com suspeita de DM monogênico



3.7 REANÁLISE GENOTÍPICA DOS DADOS MOLECULARES

Como preconizado pelo ACMG¹⁰⁷, os dados moleculares provenientes do SLE foram resubmetidos ao um novo processo de análise de bioinformática, priorização das variantes alélicas e classificação de patogenicidade das novas variantes encontradas. Todo este processo foi realizado com versões atualizadas dos programas (*softwares*) que funcionam em cadeia (*pipeline*).

3.7.1 Análise de bioinformática

Inicialmente os dados brutos oriundos do sequenciamento foram mapeados e alinhados ao genoma-referência e, a seguir, listadas todas as divergências existentes (variantes alélicas).

Em uma etapa posterior, denominada anotação, coletou-se de maneira automatizada, informações de bancos de dados genômicos públicos para cada variante alélica identificada. Além disso, uma avaliação do impacto funcional, a partir de

algoritmos de predição de patogenicidade (análise *in silico*) foi realizada. Todo o workflow de análise foi realizado por um servidor local do projeto Galaxy¹⁴⁰⁻¹⁴², instalado em um Ubuntu versão 15.10. A reanálise dos dados foi feita de acordo com o seguinte fluxo de trabalho:

- [1] Análise de qualidade: checagem da estrutura dos arquivos e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas por amostra. *Softwares*: **FASTQ Groomer**¹⁴³ e **FASTQC**¹⁴⁴.
- [2] Controle de qualidade: retirada da sequência dos adaptadores e de nucleotídeos e *reads* de baixa qualidade. *Software*: **FASTX-Toolkit**¹⁴³.
- [3] Alinhamento: alinhamento das sequências a uma referência do genoma humano (hg19 UCSC / b37 GRC/NCBI) para determinação das coordenadas genômicas de cada fragmento (*read*). *Software*: **BWA** (Burrows-Wheeler Aligner)¹⁴⁵.
- [4] Genotipagem ou “chamada de variantes”: a partir do melhor alinhamento possível, foi realizada a genotipagem da amostra, que consistiu em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos existentes – SNVs (*single nucleotide variants*): variantes de um único nucleotídeo) e *indels* (pequenas deleções e/ou inserções). Foi feita a listagem de todas as alterações divergentes da sequência de referência (variantes alélicas), gerando o arquivo *.VCF* (*variant call format*). Tipicamente foram listadas centenas ou milhares de variantes, o que tornaria impossível a verificação manual de cada uma delas. *Software*: **FreeBayes** (*Bayesian genetic variant detector*)¹⁴⁶.
- [5] Anotação: esta etapa consistiu em (a) anotar as variantes identificadas e (b) simular, computacionalmente, o impacto funcional de cada uma. *Software*: **ANNOVAR**¹⁴⁷. 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; Arquivo Brasileiro Online de Mutações - ABraOM);
 - 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/>;
- REVEL: <https://sites.google.com/site/revelgenomics/>

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

[6] Chamada das CNVs nucleares: ocorreu a partir dos arquivos de alinhamento obtidos na etapa [3], utilizando o *software Copy Number Targeted Resequencing Analysis (CONTRA)*¹⁴⁸. O algoritmo é capaz de identificar a presença de deleções ou duplicações de grandes regiões a partir da comparação da cobertura do sequenciamento do paciente, com uma linha de base criada pela análise de cobertura de vários indivíduos.

[7] Chamada de CNVs mitocondriais: ocorreu a partir dos arquivos de alinhamento obtidos na etapa [3], utilizando o *software Mitochondrial DNA Deletion Prediction Tool – eKLIpse*¹⁴⁹. O algoritmo é capaz de identificar a presença de deleções de grandes regiões a partir do mecanismo de *Split Read*. Este método baseia-se na identificação de *reads* que se dividem em duas regiões distantes do genoma de referência, o que pode indicar a presença de um ponto de quebra e, portanto, de uma CNV.

3.7.2 Priorização dos achados moleculares

Diante do grande número de variantes chamadas, o objetivo desta etapa é reduzir o número de variantes candidatas, auxiliar no processamento e distinção daquelas causadoras de doenças (ou potencialmente relacionadas ao fenótipo do indivíduo).

Não existem critérios fixos e padronizados para esta priorização. À medida que a literatura científica acumula novos conhecimentos sobre os diversos fenótipos e suas respectivas associações com defeitos moleculares, esses critérios são aprimorados. Esta etapa foi baseada em três pilares de recomendações para estudo em diabetes monogênico: 1- Consenso de prática clínica de 2022 do ISPAD (*International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*)¹⁵⁰; 2- Grupos do MDEP¹⁵¹ (*Monogenic Diabetes Expert Panel*) para curadoria gênica (*Monogenic Diabetes Gene Curation Expert Panel* - <https://clinicalgenome.org/affiliation/40016/>) e curadoria de variantes (*Monogenic Diabetes Variant Curation Expert Panel* - <https://clinicalgenome.org/affiliation/50016/>) 3- Diretriz da ADA (*American Association of Diabetes*) de 2023². Além disso, o estudo de variantes mitocondriais foi guiado pelo *Mitochondrial Disease Sequence Data Resource* (MSeqDR - <https://mseqdr.org/expert.php>)¹⁵², consórcio de especialista ligado ao ClinGen (<https://clinicalgenome.org/>) para o estudo de variantes mitocondriais.

3.7.2.1 Genes nucleares candidatos

Os painéis de genes utilizados neste trabalho foram originalmente elaborados em 2015. Foram escolhidos os genes que, na época, eram associados aos diversos fenótipos de DM monogênico. Como mencionado na introdução deste trabalho, a literatura científica alerta para a rápida evolução do conhecimento produzido no campo da genética. Para fins de magnitude, de 2019 a 2022, 5 novos genes foram associados ao fenótipo de Diabetes Neonatal¹⁵³. Dessa forma, a avaliação dos genes candidatos seguiu o racional de identificar genes que se mantiveram associados aos diversos fenótipos de DM monogênico, mesmo com o passar do tempo; e excluir da reanálise genotípica os genes (*BLK*, *PAX4* e *KFL11*) que deixaram de ser associados ao DM monogênico¹⁵⁴.

3.7.2.2 Priorização de variantes nucleares

Frequência alélica global/local: Para priorizar as variantes, foi realizada a etapa de filtragem por frequência alélica em bancos de dados genômicos públicos (GnomAD¹⁵⁵ e ABraOM¹⁵⁶). Como este é um estudo que envolve múltiplos fenótipos,

cada um com sua respectiva prevalência e modelo de herança, o filtro de frequência levou em conta estimativas para as frequências alélicas em cada fenótipo/modelo de herança:

- MODY (herança condicionada por modelo dominante): $\leq 0,004\%$ (1/25.000) - estabelecida de acordo com a frequência de um dos alelos (não patogênico) mais raro, mapeado em um gene frequentemente associado ao fenótipo de MODY (HNF1A) ¹⁵⁷, assim como seguindo as novas diretrizes do MDEP ¹⁵¹;
- MODY (herança condicionada por modelo recessivo) em variantes situadas no gene *WFS1*: $\leq 0,2\%$ (1/500) - frequência esperada para o alelo alternativo (q) (segundo equação de Hardy-Weinberg) em um fenótipo condicionado por mecanismo recessivo de herança com prevalência (q²) de 1/25.000 | 0,004% ¹⁵⁷;
- DMN (herança condicionada por modelo dominante): $\leq 0,001\%$ (1/100.000) - prevalência estimada de DMN entre nascidos vivos ¹³²;
- DMN (herança condicionada por modelo recessivo): $\leq 0,3\%$ (1/300) - frequência esperada para o alelo alternativo (q) (segundo equação de Hardy-Weinberg) em um fenótipo condicionado por mecanismo recessivo de herança com prevalência (q²) de 1/100.000 | 0,001% ¹³²;
- LPD parcial familiar (herança condicionada por modelo dominante): $\leq 0,001\%$ (1/100.000) - prevalência estimada de LPD parcial familiar entre nascidos vivos ¹³⁷;
- Síndrome de Wolfram (herança condicionada por modelo recessivo): por se tratar de um fenótipo raro com amplo espectro de frequência populacional estimada (entre 1/55.000 e 1/770.000) ^{158,159}, optou-se, aqui, seguir as regras de frequência estipuladas para o fenótipo recessivo de DM neonatal;

Dessa forma, a fim de otimizar a busca de variantes possivelmente causadoras, duas etapas, uma mais restrita e outra mais ampla, de filtragem, foram realizadas.

1- Primeira etapa: mais restrita, em busca de variantes em heterozigose, homozigose ou heterozigose composta, muito raras (muitas delas exclusivas), com a MAF

(*minor allele frequency*), calculada com base na prevalência dos fenótipos em herança autossômica dominante (MODY, DM Neonatal, LPD parcial familiar). O filtro de frequência utilizado aqui foi o de 0,004% obtido pelo fenótipo mais comum da coorte do presente trabalho (MODY).

2- Segunda etapa: mais ampla em busca de variantes em homozigose ou heterozigose composta não tão raras, com a MAF calculada baseada na prevalência dos fenótipos em herança autossômica recessiva (MODY causados por variantes na *WFS1*, DM neonatal e Síndrome de Wolfram). O filtro de frequência utilizado aqui foi o de 0,2% obtido pelo fenótipo mais comum da coorte do presente trabalho (MODY).

Localização genômica: região promotora (*upstream*), codificadora e região intrônica completa.

Consequência: *loss of function* (LoF)/*null variants* (*indels*, *stop-gain*, sítios de splicing, primeira metionina), não sinônimas e sinônimas.

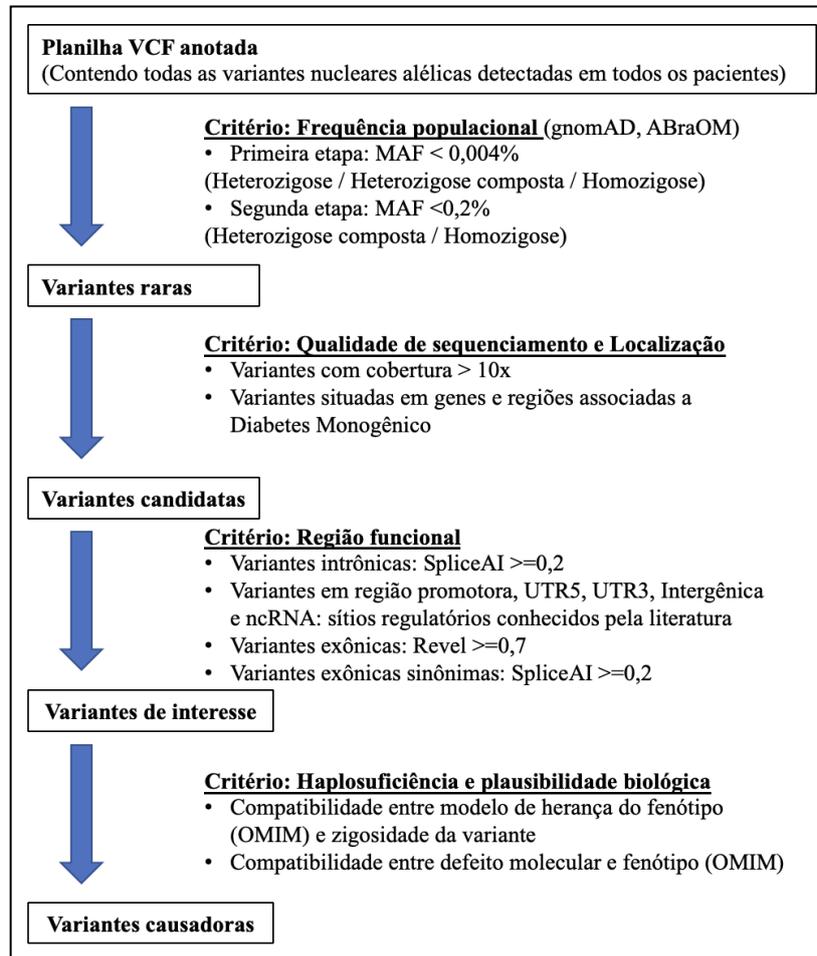
Qualidade de sequenciamento: cobertura vertical $\geq 10X$.

Confirmação visual das variantes selecionadas: realizada através do software IGV (*Integrative Genomics Viewer*). Etapa com a finalidade de afastar falsas variantes chamadas incorretamente na etapa de genotipagem. Além disso, sua utilização permite identificar deleções não detectadas pelas etapas anteriores de bioinformática.

Priorização *in silico*: foram priorizadas as variantes em que todos os preditores *in silico* apontaram como deletérias ou, quando não for possível a avaliação ampla *in silico*, seguimos a recomendação do MDEP¹⁵¹ de priorizar a pontuação obtida pelo REVEL¹⁶⁰. Para esta ferramenta, as variantes não sinônimas com pontuação $\geq 0,7$ foram selecionadas. Em relação às variantes sinônimas ou situadas em sítios não canônicos de splicing (intrônicas profundas), a pontuação ≥ 0.2 no SpliceAI¹⁶¹ foi priorizada.

Haplossuficiência: relação concordante entre modelo de herança do fenótipo pelo OMIM descrito para o gene que se localiza a variante encontrada e sua zigosidade.

De forma geral, essas etapas se encontram resumidas pelo fluxograma da Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma de priorização de variantes nucleares

3.7.2.3 Priorização de CNVs nucleares

A priorização das CNVs foi realizada, utilizando o *log-ratio* e o valor de significância estatística (*p*) das variantes identificadas pelo software CONTRA. *Log-ratios* próximos de -1,0, com valores de *p* ajustados inferiores a 0,05, indicam a presença de deleções em heterozigose. As regiões com deleções em homozigose apresentam *log-ratios* muito baixos, cerca de -7,0. E *log-ratios* próximos de +1,0 indicam a presença de duplicações. O critério utilizado para a priorização foi $\pm 0,7$. As variantes nesta etapa identificadas foram classificadas em relação a sua patogenicidade de acordo com diretrizes específicas do ACMG¹⁶² para CNVs nucleares com auxílio da ferramenta para somatória de pontos *CNV Pathogenicity Calculator - ClinGen* (<https://cnvcalc.clinicalgenome.org/cnvcalc/>).

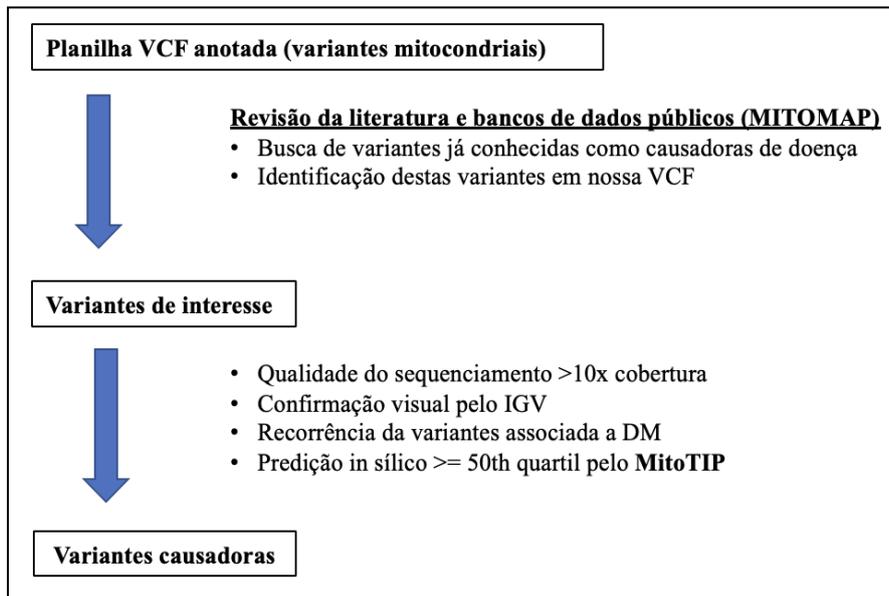
3.7.2.4 Priorização de variantes mitocondriais

O genoma mitocondrial possui uma taxa de mutação por nucleotídeo mais elevada quando comparado ao genoma nuclear. Isso se deve a diversos fatores⁸²: proximidade com reações de oxidação (produção de radicais livres), o sistema de reparo do DNA mitocondrial é mais simples e menos eficiente, maior atividade de replicação e nível de organização do material genético mais elementar. Por este motivo, muitas variantes identificadas são, inclusive, adquiridas de forma somática, ao longo do envelhecimento do indivíduo, sem que represente algo patogênico e, portanto, com pouca influência no fenótipo.

Dessa forma, a busca de variantes mitocondriais (Figura 4) com potencial relevância para explicar o fenótipo do indivíduo ocorreu de forma oposta à busca de variantes do genoma nuclear: primeiro foram revisadas na literatura e banco de dados populacionais, (Mitomap - <https://mitomap.org/MITOMAP/ConfirmedMutations>) variantes mitocondriais já, conhecidamente, patogênicas e após ocorreu a busca ativa destas variantes em nossa coorte. Em seguida, a variante identificada nessas duas etapas foi reclassificada pelos critérios do ACMG adaptados às variantes mitocondriais¹⁵² com auxílio da ferramenta MITOMASTER¹⁶³.

Os seguintes critérios foram utilizados para classificação de patogenicidade das variantes mitocondriais

- **Recorrência da variante associada à DM na literatura científica:** MITOMAP^{164, 165} e <https://www.diabetesgenes.org/> ;
- **Frequência global:** <0,002%¹⁵² (variantes raras em bancos de dados públicos MITOMAP¹⁶⁴);
- **Localização genômica:** genes codificadores de proteínas e genes de RNA ribossomal (RNAr) ou RNA transportador (RNAt);
- **Consequência:** *loss of function* (LoF)/*null variants* (*indels*, *stop-gain*) e não sinônimas;
- **Estudos funcionais:** presença de estudos funcionais robustos na literatura que corroborem com a disfunção induzida pela variante;
- **Predição *in silico* de patogenicidade:**
 - RNAt: pontuação \geq 50th quartil pelo **MitoTIP**¹⁶⁵ (*Mitochondrial tRNA Informatics Predictor*);
 - Genes codificadores de proteína: pontuação \geq 0,5 pelo **APOGEE**¹⁶⁶ (*pAthogenicity Prediction thrOugh loGistic modEl trEe*);
- **Qualidade do sequenciamento:** cobertura vertical \geq 10X
- **Confirmação visual das variantes selecionadas:** realizada através do software IGV. Etapa com finalidade de afastar falsas variantes chamadas incorretamente na etapa de genotipagem. Além disso, sua utilização permite identificar deleções não detectadas pelas etapas anteriores de bioinformática.

Figura 4 – Fluxo de priorização de variantes mitocondriais

3.7.2.5 Priorização de CNVs mitocondriais

Como as CNVs mitocondriais são associadas somente a fenótipos síndrômicos pela literatura ⁹⁴, esta etapa priorizou achados identificados pelo *software* eKLIpse em pacientes que possuíam além de hiperglicemia, outros comemorativos clínicos que o caracterizem como DM síndrômico. Estas etapas de priorização ocorreram com auxílio do visualizador genômico Franklin by Genoox (<https://franklin.genoox.com>), sendo elas:

- **Identificação visual:** através da figura *Circos plot*, onde se identifica os pontos de quebra da CNV, assim como seu percentual estimado de heteroplasmia;
- **Tamanho das CNVs:** deleções únicas com tamanho > 1kb ou múltiplas de tamanhos diversos;
- **Genes envolvidos:** região afetada que contenha genes já descritos associados a fenótipos;

- **Recorrência da CNV na literatura:** identificar sobreposição da CNV identificada com outras deleções já relatadas na literatura como patogênicas;
- **Recorrência do fenótipo na literatura:** identificar semelhança fenotípica entre o indivíduo portador da CNV identificada e manifestações clínicas descritas pela literatura para deleções na mesma região.

3.7.3 Reinterpretação de variantes de significado incerto

As variantes de significado incerto encontradas previamente ao atual estudo também foram reavaliadas. A reclassificação de sua patogenicidade pelos critérios do ACMG foi realizada através de: 1- Atualização fenotípica pelo seguimento clínico 2- Atualização pela literatura vigente; 3- Estudos de segregação.

3.7.4 Confirmação e segregação familiar das variantes priorizadas

As variantes alélicas relevantes identificadas por SLE e classificadas como mutações pontuais ou pequenas *indels* foram confirmadas pela técnica de Sanger ¹⁶⁷. Essa análise confirmatória foi direcionada apenas para a região gênica, onde foi encontrada a mutação (não foram sequenciados todos os éxons do gene afetado). 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).

3.7.5 Classificação das variantes alélicas candidatas

Todas as variantes alélicas selecionadas foram classificadas quanto ao seu grau de patogenicidade, de acordo com os critérios de avaliação do *The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP)* ¹⁰⁵ sob orientação, sempre que possível, do MDEP ¹⁵¹.

As diretrizes desenvolvidas pelo ACMG/AMP são constituídas por um conjunto de critérios envolvendo campos principais de avaliação: dados populacionais; localização genômica e consequência molecular da variante; dados fenotípicos detalhados, dados computacionais e preditivos *in silico*; dados funcionais (*in vitro* ou *in vivo*) e análise de cossegregação familiar. Para cada variante em cada um destes critérios é atribuído um código com peso definido (Anexo 6).

O MDEP ¹⁵¹ propõe ajustes nos critérios do ACMG/AMP a fim de melhorar a acurácia e concordância na interpretação de variantes situadas em genes relacionados ao diabetes monogênico. Até o momento, todos os critérios do ACMG possuem regras específicas para os genes mais comuns: *GCK*, *HNF1A* e *HNF4A* (Anexo 7). Entendendo a importância de uma interpretação comum para a melhor comunicação de achados pela comunidade científica, essas regras foram seguidas para estes genes. Em relação aos achados em demais genes contidos em nosso painel, sempre que possível, essas regras foram também aplicadas como auxílio para melhor interpretação das variantes.

As variantes alélicas mitocondriais candidatas foram avaliadas quanto a sua patogenicidade por critérios específicos para o genoma mitocondrial elaborados pelo consórcio de especialistas no tema *Mitochondrial Disease Sequence Data Resource (MSeqDR)* ¹⁵² guiados também pelo ACMG. Além disso, estas variantes foram confrontadas em relação às informações publicadas na literatura, por meio do banco de dados populacionais do MITOMAP ¹⁶⁴ com auxílio do software MITOMASTER ¹⁶³. A ferramenta de predição *in silico* MitoTIP ¹⁶⁵ foi utilizada para o auxílio na interpretação de patogenicidade.

O conjunto de códigos atribuídos a uma determinada variante é utilizado para classificá-la quanto à sua evidência de patogenicidade em um sistema de cinco níveis: **patogênica; provavelmente patogênica; significado incerto; provavelmente benigna e benigna** ^{151, 168}.

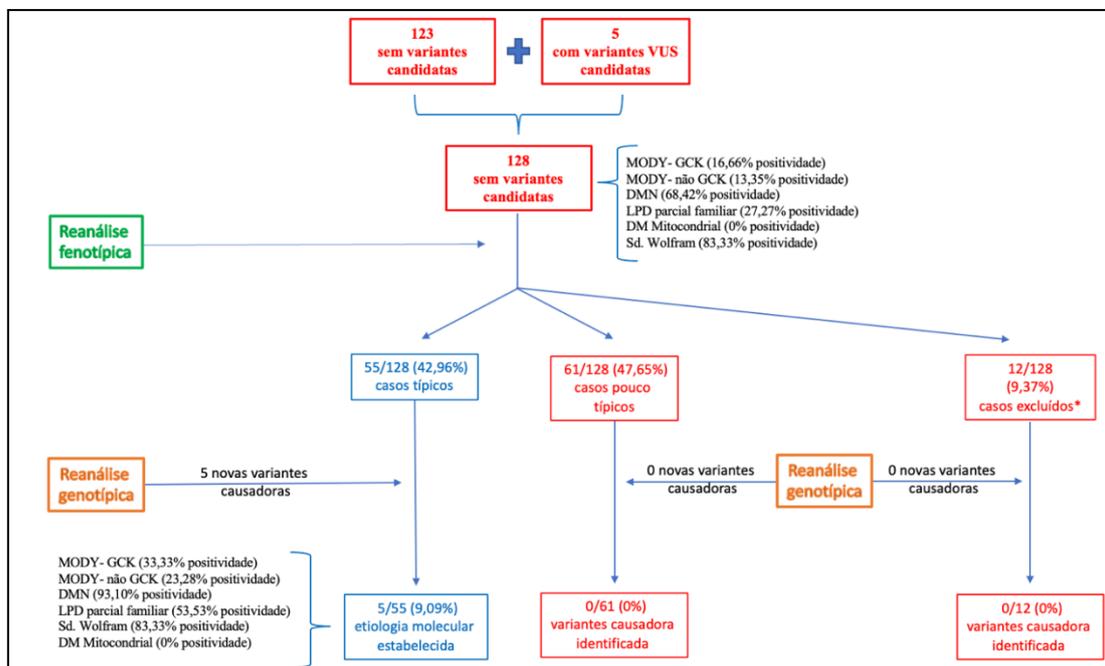
4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados da reanálise fenotípica e genotípica serão apresentados de forma separada. Primeiramente, será descrita a coorte do ponto de vista clínico, classificando os fenótipos em típicos e pouco típicos. Em seguida, será feita a descrição das variantes encontradas após várias etapas de priorização alélica, até a identificação das variantes possivelmente causadoras. Por fim, as variantes priorizadas serão correlacionadas com o fenótipo, revisados pela reanálise fenotípica, do indivíduo que a possui, a fim de permitir uma adequada classificação de sua patogenicidade pelos critérios do ACMG.

De forma resumida, os resultados da reanálise combinada genotípica e fenotípica encontram-se ilustrados na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma do resumo dos resultados obtidos após reanálise combinada fenotípica e genotípica



*8 indivíduos com hiperglicemia transitória resolvida + 4 indivíduos sem dados clínicos suficientes

VUS: variant of uncertain significance; **MODY:** maturity onset diabetes of the young; **DMN:** diabetes mellitus neonatal; **LPD:** lipodistrofia; **DM:** diabetes mellitus; **Sd. Wolfram:** síndrome de wolfram;

Após a primeira etapa de reanálise fenotípica, 12 (9,37%) indivíduos foram excluídos: 8 por hiperglicemia resolvida ao longo do tempo (7 do grupo de suspeita para MODY-GCK e 1 do grupo MODY-não GCK), 4 por dados clínicos insuficientes (1 do grupo de DMN e 1 do grupo de MODY-GCK e 3 do grupo de MODY-não GCK). Ao todo **61 (47,75%) dos indivíduos** foram classificados como tendo **fenótipo pouco típico** enquanto **55 (42,96%)** apresentaram **fenótipo típico**.

Seguindo para a etapa de reanálise genotípica, esta não foi capaz de identificar novos defeitos moleculares nos pacientes excluídos e nem nos classificados como tendo fenótipo pouco típico pela etapa anterior. Em contrapartida, **ao todo, 5 novos achados moleculares** foram identificados na **coorte de casos típicos**: 1 no grupo de MODY-GCK, 1 no grupo de MODY-não GCK, 1 no grupo de DMN, 2 no grupo de LPD parcial familiar.

Somados, a reanálise combinada fenotípica e genotípica foi capaz de aumentar o diagnóstico molecular em: 16,67% (de 16,66 para 33,33%) para a coorte de MODY-GCK (Figura 6); 9,93% (de 13,35 para 23,28%) para a coorte de MODY- não GCK (Figura 7); 24,68% (de 68,42 para 93,10%) para a coorte de DMN (Figura 8); 26,03% (de 27,27 para 53,3%) para a coorte de LPD parcial familiar (Figura 9). A reanálise combinada não foi capaz de alterar o percentual de positividade em diagnóstico molecular nos casos de Síndrome de Wolfram nem de casos de DM mitocondrial.

Se analisarmos a positividade total, desde o início do estudo molecular destes indivíduos, englobando todas as etapas de investigação por Sanger, MLPA, tNGS (Figura 1), e da reanálise (Figura 5), tem-se as seguintes positivities finais para cada fenótipo: 85,56% para MODY-GCK; 38,29% para MODY-não GCK; 93,33% para DMN; 53,3% para LPD parcial familiar; 83,33% para Síndrome de Wolfram e 0% para DM mitocondrial.

Figura 6 – Esquematização do impacto da positividade molecular após reanálise da coorte de indivíduos suspeitos para MODY-GCK

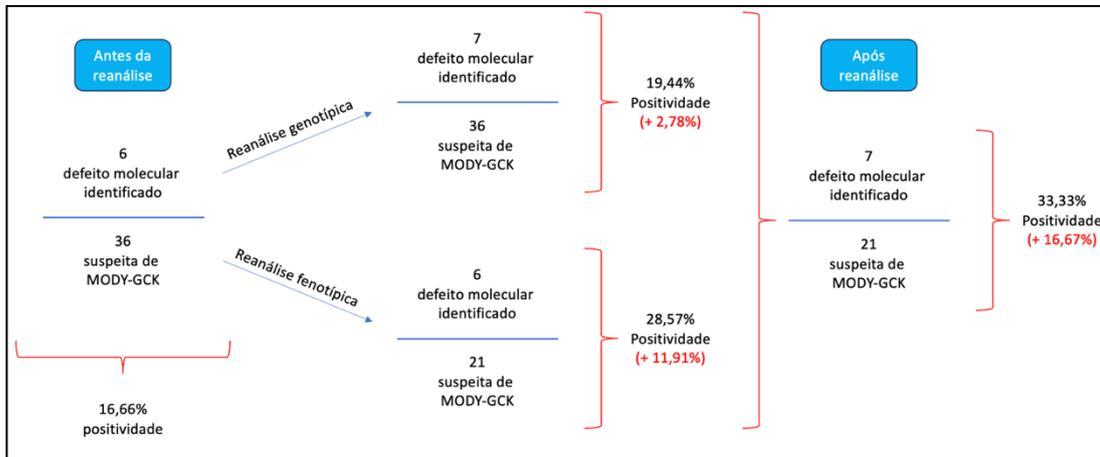


Figura 7 – Esquematização do impacto da positividade molecular após reanálise da coorte de indivíduos suspeitos para MODY- não GCK

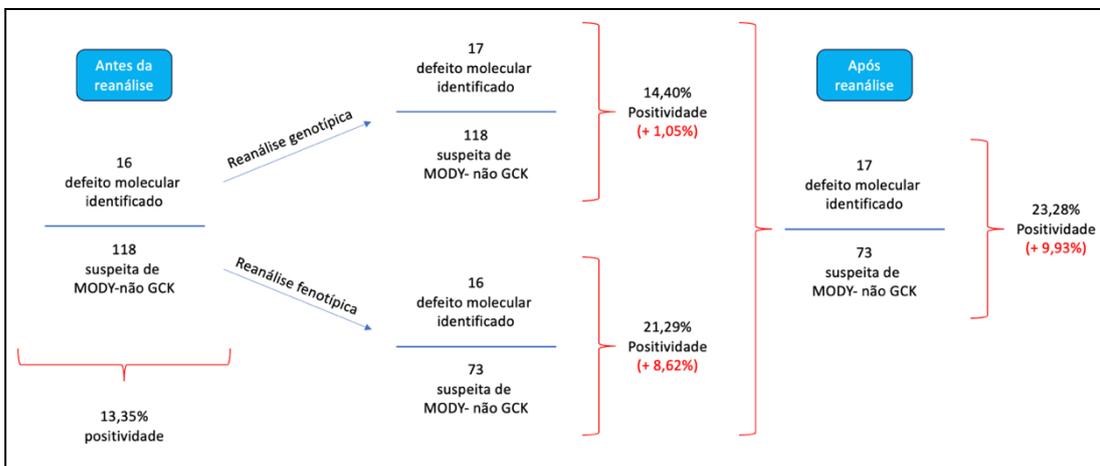


Figura 8 - Esquematisação do impacto da positividade molecular após reanálise da coorte de indivíduos suspeitos para DMN

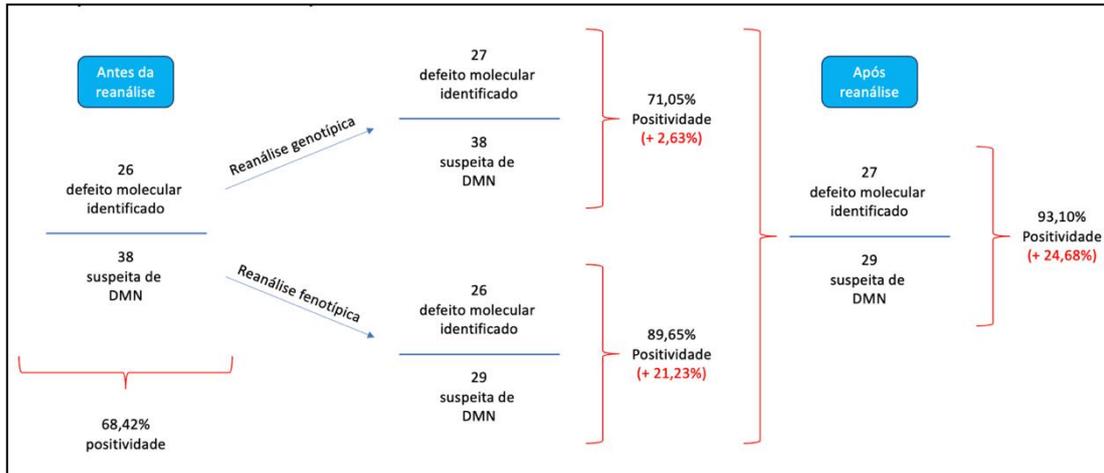
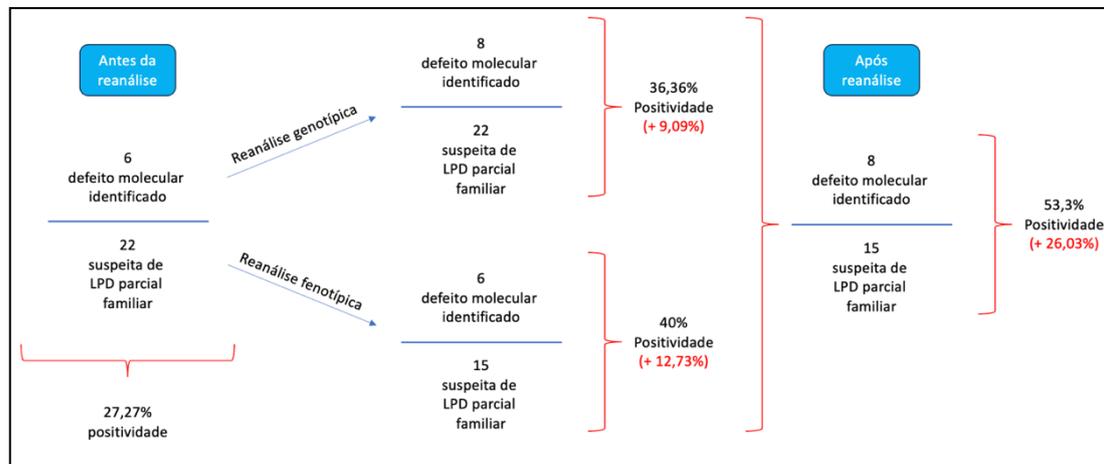


Figura 9 – Esquematisação do impacto da positividade molecular após reanálise da coorte de indivíduos suspeitos para LPD parcial familiar



4.1 REANÁLISE FENOTÍPICA E DESCRIÇÃO CLÍNICA DA COORTE

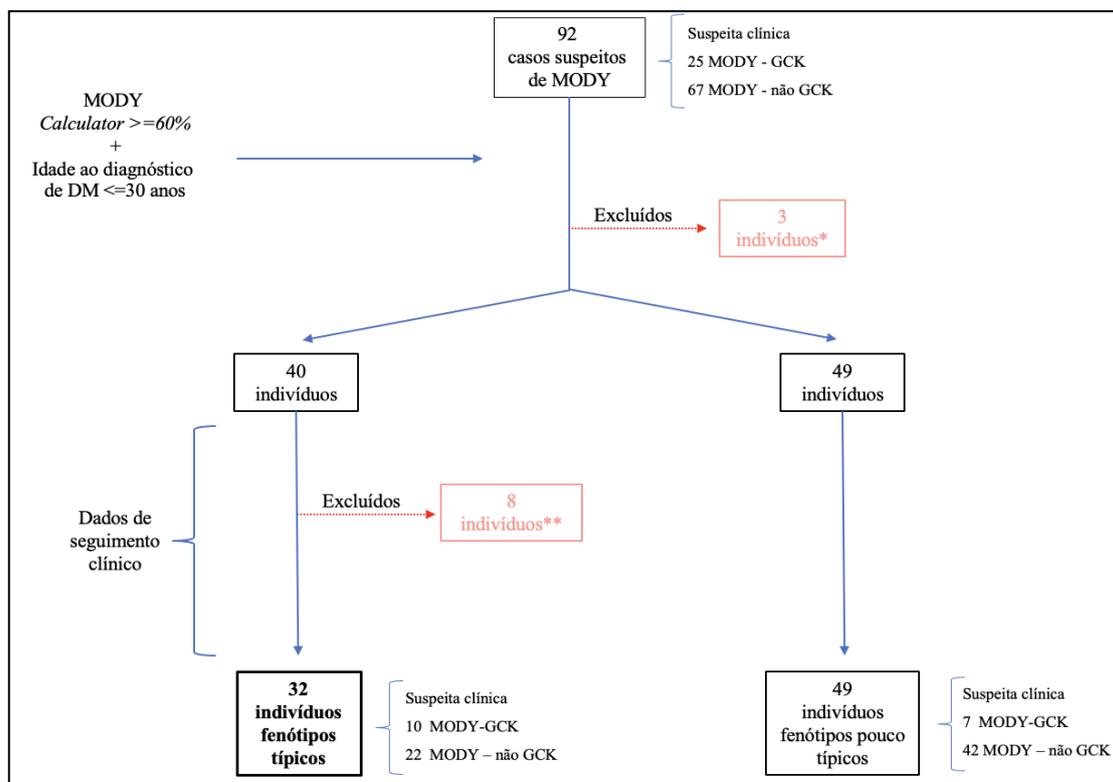
4.1.1 Probandos com suspeita clínica de MODY

A etapa de priorização dos 92 indivíduos suspeitos de MODY (25/92 MODY GCK e 67/92 MODY não GCK) está resumida na Figura 10.

Depois de aplicar a ferramenta *MODY calculator*, selecionar os casos com base na idade do diagnóstico de DM e coletar novos dados clínicos de seguimento, **32 dos 92 indivíduos (34,78%) foram considerados casos típicos para o fenótipo de MODY**. Os outros **49 indivíduos (53,26%) foram considerados como fenótipos pouco típico para MODY** por vários motivos: 36 indivíduos (73,46%) não pontuaram acima de 60% no *MODY calculator* e/ou tinham mais de 30 anos no diagnóstico de DM; 9 indivíduos (18,36%) não pontuaram acima de 60% no *MODY calculator* e tinham menos de 30 anos no diagnóstico de DM; 4 indivíduos (8,16%) não pontuaram na calculadora de MODY por diagnóstico de DM após 35 anos de idade.

Ao todo, **11 indivíduos (11,95%) com suspeita de MODY foram excluídos** da reanálise pelos seguintes motivos: 3 não apresentaram dados clínicos suficientes disponíveis em nossos bancos de dados para adequada caracterização de seu DM; 8 indivíduos apresentaram resolução da hiperglicemia ao longo do seguimento clínico. Um breve resumo da descrição fenotípica destes indivíduos se encontra no Anexo 8.

Figura 10 – Fluxograma de priorização fenotípica dos indivíduos com suspeita de MODY



*3 indivíduos sem dados clínicos suficientes;

**8 indivíduos com hiperglicemia resolvida durante seguimento;

DM: diabetes mellitus.

A descrição fenotípica dos 17 indivíduos suspeitos de MODY - GCK, sendo 10 (58,8%) considerados típicos e 7 (41,2%) pouco típicos, está resumida na Tabela 4. A Tabela 5 apresenta a descrição fenotípica dos 64 indivíduos suspeitos de MODY - não GCK, com 22 (34,4%) considerados típicos e 42 (65,6%) pouco típicos.

Tabela 4 – Descrição fenotípica da coorte com suspeita de MODY – GCK

Características clínicas	MODY - GCK (n=17)		
	Típico (n=10)	Pouco típico (n=7)	p-valor
Idade ao dx DM (anos)	12.5 (7.5 - 18); n=10	33 (31.5 - 34.5); n= 7	0,006221
HbA1c ao Dx (%)	6 (5.4 - 6.1); n= 5	5.7 (5.6 - 6.025); n= 6	0,9464
Sintomas de políis	0	0	NA
Glicemia ao Dx (mg/dL)	119 (101 - 122); n= 5	105 (90 - 110); n= 5	0,1245
MODY calculator (%)	75 (75 - 75); n= 10	75 (53.7 - 75); n= 7	0,03338
IMC ao Dx	19 (19 - 19); n= 3	20.95 (20.425 - 22); n= 5	0,5143
Peso ao Dx	n= 9	n= 7	0,487
Baixo peso	1 (11,1%)	2 (28,6%)	
Eutrófico	7 (77,7%)	5 (71,4%)	
Sobrepeso	0	0	
Obesidade	1 (11,2%)	0	
Uso de insulina	n= 10	n= 7	1
Não usa	9/10 (90%)	6/7 (85,7%)	
Imediato	0/10	0/7	
Dentro de 6 meses	0/10	0/7	
Após 6 meses	1/10 (10%)	1/7 (14,3%)	
Comorbidades metabólicas ao Dx e/ou seguimento	n= 10	n= 7	1
Sim	3/10 (30%)	2/7 (28,6%)	
Não	7/10 (70%)	5/7 (71,4%)	
Tempo de DM ao término do seguimento clínico (anos)	15 (8 - 17); n= 9	8 (4.5 - 13); n= 7	0.18
Peptídeo C ao término do seguimento clínico (ng/dL)	2.2 (1.5 - 2.8); n= 8	1.6 (1.4 - 2); n= 5	0.047
Peptídeo C mais elevado durante seguimento clínico (ng/dL)	2.2 (1.9 - 2.6); n= 4	2.3 (2.2 - 2.8); n= 3	0.69
Peptídeo C mais baixo durante seguimento clínico (ng/dL)	1.1 (0.9 - 1.3); n= 4	1.5 (1.4 - 1.7); n= 3	0.29
Taxa de filtração glomerular ao término do seguimento clínico (CKD-EPI)	118 (106 - 122); n= 8	105 (100 - 109); n= 5	0.14
Familiares com Dx DM	9/10 (90%)	7/7 (100%)	1
Comorbidades metabólicas em familiares	n= 9	n= 7	0,04382
Sim	7/9 (77,8%)	1/7 (14,3%)	
Não	2/9 (22,2%)	6/7 (85,7%)	
Idade início de DM na família	n= 9	n= 7	0,8965
< 18 anos	0	0	
Entre 18 e 30 anos	0	1/7 (14,3%)	
> 30 anos	9/9 (100%)	6/7 (85,7%)	

DM: diabetes mellitus; **Dx:** diagnóstico; **CKD-EPI:** Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

Dados expostos em mediana (intervalo interquartil), sendo n baseado no número total de indivíduos para os quais a informação estava disponível.

Tabela 5 – Descrição fenotípica da coorte com suspeita de MODY - Não GCK

Características clínicas	MODY - não GCK (n=64)		
	Típico (n=22)	Pouco típico (n=42)	p-valor
Idade ao dx DM (anos)	18.5 (15.25 - 21.75); n = 22	23 (18.25 - 31); n = 42	0,00543
HbA1c ao Dx (%)	8.4 (7.45 - 8.95) ; n= 7	9.15 (6.7 - 11); n= 9	0,4079
Sintomas de polis	3/10 (30%)	17/22 (77.3%)	0,04714
Glicemia ao Dx (mg/dL)	189 (131.5 - 250); n= 7	272 (195 - 385); n= 12	0,3195
MODY calculator (%)	75 (75 - 75); n= 22	4.6 (2 - 15.1); n= 38	1,64E-10
IMC ao Dx	22.4(20.925 - 22.4); n= 8	22.5 (20.5 - 29.5); n= 12	0,5113
Peso ao Dx	n= 19	n= 37	0,6958
Baixo peso	0	1 (2.7%)	
Eutrófico	11 (57.9%)	24 (64.9%)	
Sobrepeso	7 (36.8%)	9 (24.3%)	
Obesidade	1 (5.3%)	3 (8.1%)	
Uso de insulina	n= 21	n=42	0,001406
Não usa	10 (47,6%)	10 (23,8%)	
Imediato	2 (9,6%)	24 (57,2%)	
Dentro de 6 meses	0	0	
Após 6 meses	9 (42,8%)	8 (19%)	
Comorbidades metabólicas ao Dx e/ou seguimento	n= 21	n= 42	1
Sim	14 (66,7%)	27 (64,3%)	
Não	7 (33,3%)	15 (35,7%)	
Tempo de DM ao término do seguimento clínico (anos)	13.5 (6.7 - 31.2); n= 20	17 (8 - 24.7); n= 38	0.97
Peptídeo C ao término do seguimento clínico (ng/dL)	2 (1.1 - 2.5); n= 19	1.4 (0.9 - 2.2); n= 34	0.79
Peptídeo C mais elevado durante seguimento clínico (ng/dL)	2.4 (1.9 - 3.1); n= 17	2.1 (1.4 - 2.); n= 29	0.22
Peptídeo C mais baixo durante seguimento clínico (ng/dL)	1.6 (1.2 - 2.3); n= 17	1 (0.4 - 1.3); n= 29	0.05
Taxa de filtração glomerular ao término do seguimento clínico (CKD-EPI)	116 (97 - 121); n= 20	97 (85 - 114); n= 35	0.04
Familiares com Dx DM	18/20 (90%)	36/39 (92,3%)	1
Comorbidades metabólicas em familiares	n= 17	n= 33	0,03553
Sim	7 (41,2%)	25 (75,5%)	
Não	10 (58,8%)	8 (24,5%)	
Idade início de DM na família	n=17	n= 36	0,05661
< 18 anos	0	3 (8%)	
Entre 18 e 30 anos	9 (53%)	8 (22%)	
> 30 anos	8 (47%)	25 (70%)	

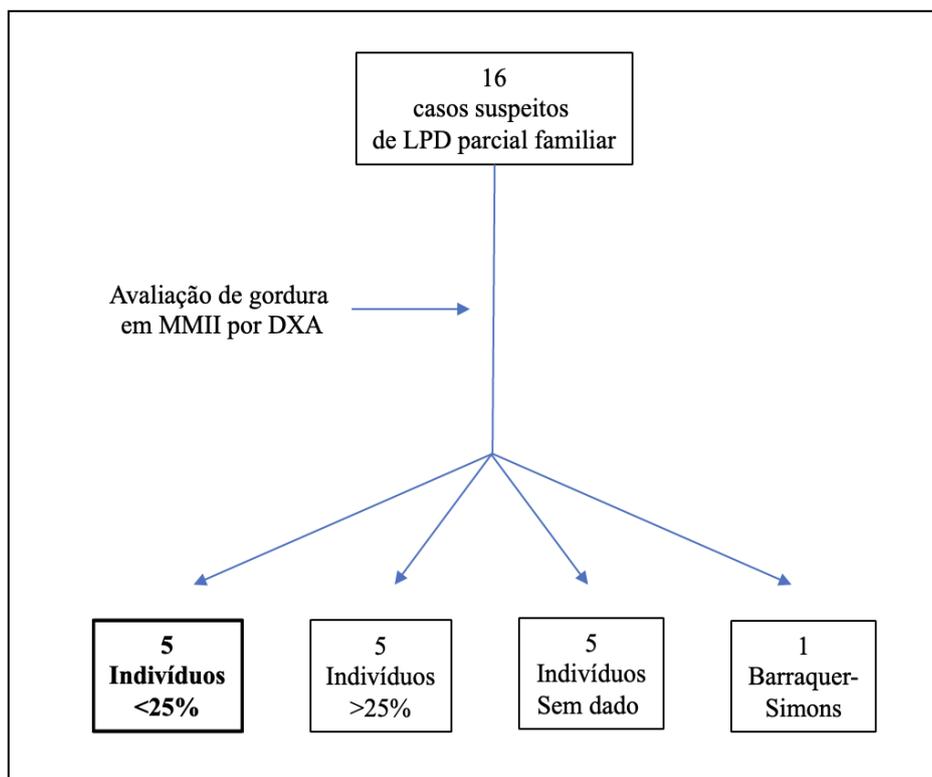
DM: diabetes mellitus; **Dx:** diagnóstico; **CKD-EPI:** Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

Dados expostos em mediana (intervalo interquartil), sendo n baseado no número total de indivíduos para os quais a informação estava disponível.

4.1.2 Probandos com suspeita clínica de LPD parcial familiar

A etapa central de priorização dos pacientes com suspeita de LPD parcial familiar foi a quantificação de gordura em membros inferiores pela DXA, resumida na Figura 11. Dos 16 indivíduos, 5 (31,25%) não tinham gordura mensurada, 5 (31,25%) possuíam gordura < 25% enquanto 5 (31,25%) apresentaram gordura > 25% em membros inferiores. Ao todo, dois indivíduos (um do grupo >25% de gordura em membros inferiores e outro do grupo sem aferição por DXA) tiveram falha de sequenciamento. Um (6,2%) paciente foi excluído da reanálise por se tratar de um quadro classificado como Barraquer-Simons, um fenótipo de etiologia molecular complexa ¹⁶⁹ não contemplada pelo painel de genes utilizado no presente estudo. As características clínicas destes indivíduos se encontram resumida na Tabela 6.

Figura 11 - Fluxograma de priorização fenotípica dos indivíduos com suspeita de LPD parcial familiar



LPD: Lipodistrofia; **DXA:** *dual-energy X-ray absorptiometry*; **MMII:** membros inferiores

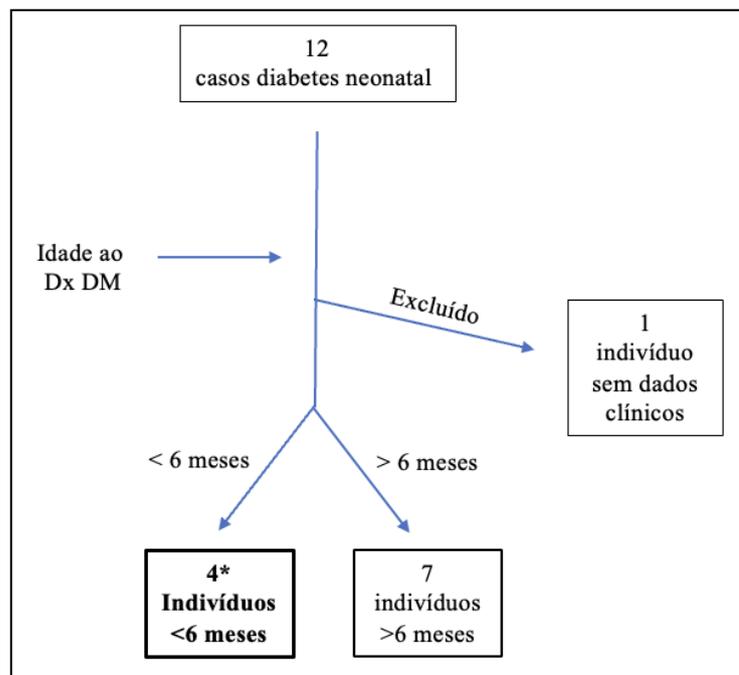
Tabela 6 – Descrição fenotípica da coorte com suspeita de LPD parcial familiar

Probando	Sexo	Idade ao Dx DM (anos)	Idade ao final do seguimento (anos)	Gordura em MMII (%)	FMR (%Gordura tronco / %gordura MMII)	Gordura total (%)	Glicada ao Dx DM (%)	Peso ao Dx DM	Uso de insulina	Maior IMC atingido no seguimento	Dose insulina UI/kg	Comorbidades metabólicas	Triglicérides mais elevado (mg/dL)	Colesterol total mais elevado (mg/dL)	Terapia hipolipemiente	História de Pancreatite	Familiares primeiro grau com fenótipo semelhante de perda de gordura
Percentual de gordura em MMII por DXA < 25% (n=5)																	
1	M	12	25	13	1,6	16,7	6,8	Eutrófico	Não usa	23	Não usa	Esteatose / Acantose / DLP / HAS	218	148	Não	Não	Não
2	F	13	25	15,2	2,02	25,9	NA	NA	Não usa	22,3	Não usa	Esteatose / SOP / DLP /	445	243	Estatina	Não	NA
3	F	37	58	16,2	1,68	26,6	NA	Sobrepeso	Após 6 meses do Dx DM	31,2	1,2	Esteatose / DLP / HAS	333	189	Fibrato	Não	Não
4	F	27	32	16,6	1,97	29	NA	Eutrófico	Ao Dx DM	24	1,3	Esteatose / SOP / Acantose / DLP / HAS	297	247	Fibrato + Estatina	Não	Não
5	F	50	63	22	1,54	30	NA	NA	NA	27	0,77	Esteatose / SOP / Acantose / DLP / HAS	304	313	Estatina	Não	Sim
Percentual de gordura em MMII por DXA > 25% (n=6)																	
6	F	33	30	26,4	1,45	32,6	10,9	Obesidade	Ao Dx DM	35,6	0,7	Esteatose / SOP / Acantose / DLP	4000	595	Fibrato + Estatina	Sim	NA
7	F	38	60	27	1,81	30,9	NA	NA	NA	23	3,3	Esteatose / DLP / HAS	257	273	Estatina	Não	NA
8	F	13	31	30	1,6	40,1	NA	Obesidade	Não usa	36	Não usa	Esteatose / SOP / Acantose / DLP / HAS	197	161	Não	Não	Sim
9	F	20	33	32	1,44	35,7	NA	NA	Ao Dx DM	35	0,5	Sop / Acantose / DLP	277	260	Estatina	Não	Não
10	F	32	65	41	0,61	19,19	NA	NA	Não usa	24	Não usa	DLP / HAS	148	161	Estatina	Não	Não
11	F	33	54	44,3	0,99	43,1	NA	NA	Após 6 meses do Dx DM	36,4	0,5	Esteatose / Acantose / DLP / HAS	360	200	Não	Não	NA
Avaliação por DXA não disponível (n=5)																	
12	F	14	15	NA	NA	NA	NA	Sobrepeso	Não usa	29	Não usa	SOP / DLP	675	227	Fibrato	Não	Sim
13	F	48	43	NA	NA	NA	7,4	Sobrepeso	Não usa	28	Não usa	Esteatose / Acantose / DLP	519	184	Não	Não	Sim
14	F	NA	50	NA	NA	NA	NA	NA	Após 6 meses do Dx DM	23	1,5	Esteatose / SOP / Acantose / DLP / HAS	565	178	Estatina	Não	NA
15	F	42	54	NA	NA	NA	NA	NA	Não usa	28,5	Não usa	Esteatose / Acantose / DLP / HAS	4876	915	Estatina	Não	Sim
16	F	30	62	NA	NA	NA	NA	NA	Após 6 meses do Dx DM	33,9	1,06	Esteatose / DLP / HAS	912	394	Estatina	Não	NA

4.1.3 Probandos com DM neonatal

Do total de 12 casos com diagnóstico de diabetes neonatal, quatro (33,3%) tiveram diagnóstico de hiperglicemia nos primeiros 6 meses de vida, enquanto 7 (58,3%) tiveram este diagnóstico entre 6 meses e 1 ano. Um indivíduo (Anexo 8) não possuiu dados clínicos suficientes para descrição fenotípica. Um indivíduo diagnosticado antes dos 6 meses de vida apresentou falha no sequenciamento. Esta etapa encontra esquematizada na Figura 12, assim como a descrição fenotípica destes indivíduos se encontra exposta na Tabela 7.

Figura 12 - Fluxograma de priorização fenotípica dos indivíduos com suspeita de DM neonatal



DM: diabetes mellitus; **Dx:** diagnóstico

*1 indivíduo com falha de sequenciamento

Tabela 7 - Descrição fenotípica dos indivíduos com suspeita de DM neonatal

Probando	Idade ao Dx DM	Anticorpos anti-ilhota	Uso de insulina	Idade final do seguimento	Histórico familiar de DM	Associações clínicas ao DM
1	1 mês	NA	Após 6 meses	44 anos	Pai, Mãe, 4 irmãos	Não
2	1 mês	Anti-GAD e Anti-IAA NRs ao Dx DM	Ao Dx DM	5 anos	Ausente	Baixo peso ao nascimento / PIG / Insuficiência exócrina pancreática
3	1 mês	Anti-GAD positivo* 45 anos após Dx DM	Ao Dx DM	50 anos	1 irmã e 4 tios paternos	Alopecia / Tireoidite de Hashimoto
4	3 meses	Anti-GAD e Anti-IA2 NRs 37 anos após DX DM	Após 6 meses	39 anos	Mãe, 2 irmãs e 2 sobrinhos	Acidentes vasculares isquêmicos de repetição no SNC
5	7 meses	Anti-GAD e Anti-IA2 NRs 5 anos após DX DM	Ao Dx DM	10 anos	Avós paterno e materno	Não
6	8 meses	Anti-GAD e Anti-IA2 NRs 42 anos após Dx DM	Após 6 meses	49 anos	Avó materna, mãe e 1 irmã	Hipotireoidismo**
7	9 meses	Anti-GAD Anti-IAA e Anti-IA2 NRs o Dx DM	Ao Dx DM	3 anos	Ausente	Não
8	10 meses	Anti-GAD e Anti-IAA NRs 4 anos após Dx DM	Ao Dx DM	11 anos	Avô materno	DM diagnosticado durante quadro infeccioso / PIG / Estrabismo / Miopia / Eritema idiopático / Dentes de Hutchinson / Sem DM aos 8 anos
9	11 meses	Anti-GAD e Anti-IA2 NRs 16 anos após Dx DM	Ao Dx DM	21 anos	Avó e Bisavó materna	Baixa estatura / Atraso DNPM / Hipotireoidismo** / Sd Nefrótica
10	12 meses	Anti-GAD NR 17 anos após Dx DM	Ao Dx DM	33 anos	Avós maternos	Não
11	12 meses	Anti-GAD e Anti-IAA NRs 6 anos após Dx DM	Ao Dx DM	12 anos	Avô paterno	Remissão do DM aos 4 anos
12	NA	NA	NA	NA	NA	Sem dados clínicos suficientes

* Anti-GAD = 56U/mL (VR <10)

** AntiTPO e Anti TG NRs

DM: diabetes Mellitus; **DNPM:** desenvolvimento neuropsicomotor; **Dx:** diagnóstico; **NRs:** não reagentes; **PIG:** pequeno para idade gestacional; **Anti-GAD:** antidescarboxilase do ácido glutâmico; **Anti-IA2:** antitirosina fosfatase; **Anti-IAA:** autoanticorpo anti-insulina; **AntiTPO;** tireoperoxidase.

4.1.4 Probandos com suspeita de DM mitocondrial e Síndrome de Wolfram

As características clínicas de 7 pacientes com suspeita de DM Mitocondrial e 1 com suspeita de Síndrome de Wolfram estão descritas na Tabela 8

Tabela 8 - Descrição fenotípica dos indivíduos com DM Mitocondrial e Síndrome de Wolfram

Probando	Idade (anos) ao Dx DM	Idade (anos) final do seguimento	Anticorpos anti ilhota	Uso de insulina	Histórico familiar	Associações clínicas ao DM
DM Mitocondrial						
1	3	70	Anti-GAD, Anti-IA2 e Anti-IAA NRs 61 anos após Dx DM	Desde Dx DM	Avô paterno, Pai, 1 irmão	Hipoacusia
2	6	19	Anti-GAD NR ao Dx DM	Desde Dx DM	Mãe DM isolado	Hipoacusia / Retinite pigmentosa / Oftalmoplegia
3	6	7	NA	Desde Dx DM	Ausente	Hipoacusia
4	17	57	Anti-GAD NR 40 anos após Dx DM	Desde Dx DM	Avó materna, Mãe, 1 Irmã	Hipoacusia
5	27	46	Anti-GAD, Anti-IA2 e Anti-IAA NRs 11 anos após Dx DM	Após 6 meses Dx DM	Negativo para DM / Amaurose / Surdez	Surdez congênita bilateral / Amaurose a direta congênita
6	38	44	NA	Após 6 meses Dx DM	Ausente	Oftalmoplegia / Distúrbio de condução cardíaca
7	70	70	NA	Desde Dx DM	1 Tia materna e Mãe disfagia	Disfagia Óculo-Faríngea / Hipoacusia / Disartria / Oftalmoplegia
Síndrome de Wolfram						
1	7	21	Anti-GAD positivo * Anti-IA2 e Anti insulina NRs ao DX DM	Desde Dx DM	Avô materno e 1 primo paterno	Hipoacusia / Diabetes Insipidus / Atrofia do Nervo Óptico

DM: diabetes mellitus; **Dx:** diagnóstico; **NRs:** não reagentes; **Anti-GAD:** antidescarboxilase do ácido glutâmico; **Anti-IA2:** antitirosina fosfatase; **Anti-IAA:** autoanticorpo anti-insulina; **AntiTPO:** tireoperoxidase.

*1081U/ml (Referência <25 U/mL)

4.2 REANÁLISE GENOTÍPICA E CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO

Ao todo, 13 variantes (sendo 8 novas e 5 variantes VUS previamente identificadas) foram priorizadas e se encontram resumidas na Tabela 9. O detalhamento das etapas de filtragem, a descrição das variantes encontradas, assim como a correlação com seus respectivos fenótipos serão apresentados nos itens a seguir.

Em paralelo, 2 pacientes tiveram variantes identificadas correlacionadas aos seus respectivos fenótipos explicadas por situações extrínsecas à nossa reanálise direta. Estas também estão descritas na Tabela 9 e as circunstâncias que levaram ao seu achado estão na seção 4.2.5.

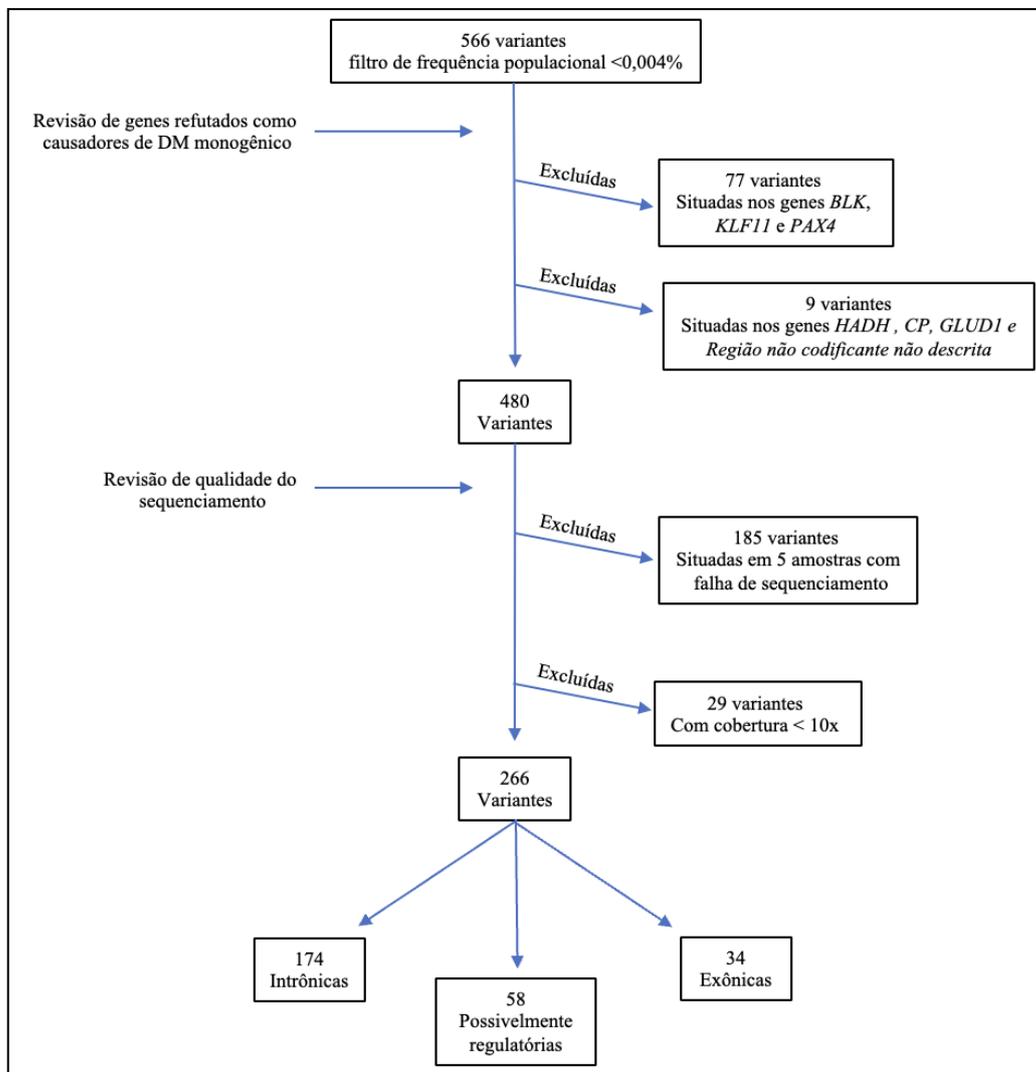
Tabela 9 - Resumo dos achados moleculares e seus respectivos fenótipos após reanálise genotípica

Probando	Fenótipo após reanálise	Variante / Consequência	Zigosidade	Frequência alélica*	Classificação patogenicidade
Variante intrônica profunda					
1	Pouco típico para MODY	<i>GCK</i> (NM_000162.5):c.864-279_864-271del	Heterozigose	Ausente	VUS
Variantes em região regulatória					
2	Típico para DMN	Chr10:23508363A>G / <i>PTF1A enhcancer</i>	Homozigose	Ausente	Patogênica
3	Típico para MODY	<i>HNF1A</i> (NM_000545.6): c.-285 C>T / Promotor	Heterozigose	Ausente	Provavelmente patogênica
Variantes exônicas					
4	Típico para MODY	<i>WFS1</i> (NM_006005.3):c.911T>C / (p.Ile304Thr)	Heterozigose	Ausente ABraOM / 0,0008% gnomAD	VUS
5	Típico para MODY	<i>CEL</i> (NM_001807.6):c.296A>C / (p.Asp99Ala)	Heterozigose	Ausente	Provavelmente benigna
6	Pouco típico para MODY	<i>RFX6</i> (NM_173560.4): c.1494_1495insGGA / (p.Lys498_Trp499insGly)	Heterozigose	Ausente	VUS
Variante mitocondrial					
7	Típico para LPD parcial familiar	m.8344 A>G / tRNA (Lys)	Heteroplasmia: 658/3458 (wt/mt)	0,007% MITOMAP	Provavelmente patogênica
Variante nuclear tipo CNV					
8	Típico para MODY	<i>GATA6</i> Chr18:g.19780797_19780917del	Heterozigose	Ausente	VUS
Variantes previamente identificadas como VUS e suas novas classificações pelo ACMG					
9	Típico para MODY	<i>INS</i> (NM_000207.3):c.17G>A / (p.Arg6His)	Heterozigose	0,0427% ABraOM / 0,0086% gnomAD	VUS → Benigna
10	Pouco típico para MODY	<i>HNF1B</i> (NM_000458.4):c.226G>T / (p.Gly76Cys)	Heterozigose	0,4105% ABraOM / 0,055% gnomAD	VUS → Benigna
11	Pouco típico para MODY	<i>PDX1</i> (NM_000209.4):c.664G>A / (p.Glu222Lys)	Heterozigose	0,1642% ABraOM / 0,0018% gnomAD	VUS → Benigna
12	Típico para MODY	<i>HNF1A</i> (NM_000545.8):c.1513C>A / (p.His505Asn)	Heterozigose	Ausente ABraOM / 0,008% gnomAD	VUS → Provavelmente benigna
13	Pouco típico para MODY	<i>HNF1A</i> (NM_000545.8):c.92G>A / (p.Gly31Asp)	Heterozigose	0,082% ABraOM / 0,0075% gnomAD	VUS → Benigna
Variantes identificadas em circunstâncias extrínsecas à nossa reanálise direta					
14	Típico para MODY	<i>GCK</i> (NM_000162.5):c.127C>A / (p.Arg43Ser)	Heterozigose	Ausente	Provavelmente Patogênica
15	Típico para LPD parcial familiar	<i>MFN2</i> (NM_014874.4):c.2119C>T / (p.Arg707Trp)	Homozigose	Ausente ABraOM / 0,0251% gnomAD	Provavelmente Patogênica

4.2.1 Priorização alélica de variantes nucleares

Após a primeira etapa de priorização utilizando o filtro de frequência mais restrito $<0,004\%$ foram identificadas 566 variantes nucleares, o que computa uma média de 4,38 variantes raras por indivíduo. Posteriormente, variantes situadas em genes não mais caracterizados com o fenótipo de DM monogênico e aquelas com baixa qualidade de cobertura foram excluídas. Estas etapas se encontram no fluxograma da Figura 13.

Figura 13 – Primeira etapa de priorização de variantes nucleares



DM: diabetes mellitus

Ao término desta etapa inicial de priorização, 266 variantes foram selecionadas para análise subsequente. Dentre elas, 174 situadas em região intrônica, 34 em região

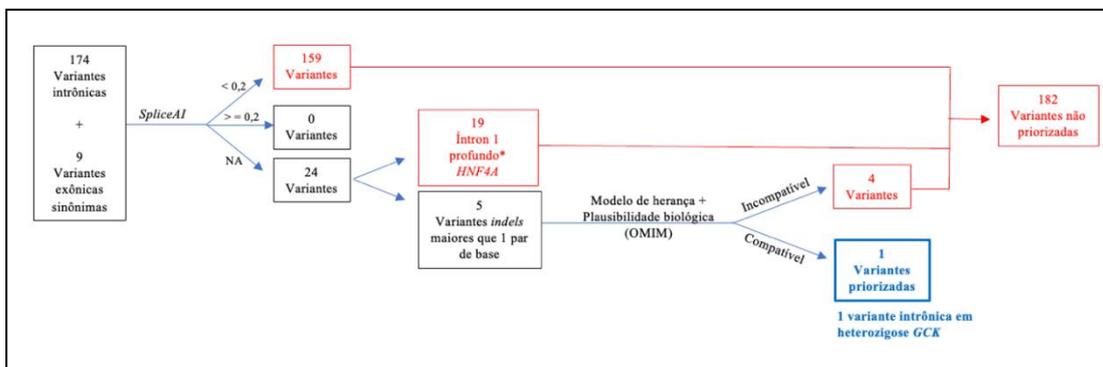
exônica (sendo 23 do tipo missense, 9 do tipo sinônima, 1 inserção *inframe* e 1 deleção *inframe*) e 58 variantes situadas em regiões possivelmente regulatórias (20 em região *Upstream*, 19 em UTR3, 7 em UTR5, 7 em RNAs não codificantes e 5 situadas em região intergênica).

A segunda etapa de priorização alélica, voltada para busca adicional de variantes menos raras ($MAF < 0,2\%$) somente em homozigose ou heterozigose composta não foi capaz de identificar nenhuma variante a mais de interesse. As variantes encontradas com esse filtro mais amplo estavam em heterozigose ou, quando em homozigose ou heterozigose composta, se tratava de variantes missenses ou sinônimas com baixas pontuações pelos preditores *in silico* (REVEL e *SpliceAI*).

4.2.1.1 Variantes intrônicas e sinônimas

Ao todo foram avaliadas 174 variantes intrônicas e 9 sinônimas, todas em heterozigose. Para isso, utilizou-se o preditor *in silico* *SpliceAI*, que excluiu 159 dessas variantes (86,8%) devido à baixa pontuação ($< 0,2$). Das 24 variantes restantes, 19 (10,4%) não puderam ser avaliadas pelo preditor por estarem localizadas em íntrons muito profundos (cerca de 5000 pares de base) do gene *HNF4A*, enquanto as outras 5 eram inserções ou deleções com variações entre 5 e 36 pares de base. Das 5 variantes que eram inserções ou deleções, 4 foram identificadas em genes incompatíveis com o fenótipo, restando apenas uma que foi priorizada, já que o defeito molecular era compatível com o fenótipo. A Figura 14 resume esta etapa de priorização. Este passo foi capaz de identificar uma variante em deleção intrônica no gene *GCK* (probando 1).

Figura 14 – Fluxo de priorização de variantes nucleares intrônicas e sinônimas



*em torno de 5000 pares de base **NA:** não aplicável **OMIM:** *online mendelian inheritance in man*

Variante intrônica c.864-279_864-271del no *GCK* – Probando 1

A variante priorizada GCK(NM_000162.5):c.864-279_864-271del se trata de uma deleção de nove pares de base localizada no íntron 7 do gene *GCK*, distando 271 pares de base do sítio canônico de splicing. Possui boa cobertura alélica e balanço alélico de AF 78,5%/AO 44/DP 56 (Figura 15). A variante não possui descrição em bancos populacionais gnomAD e ABraOM.

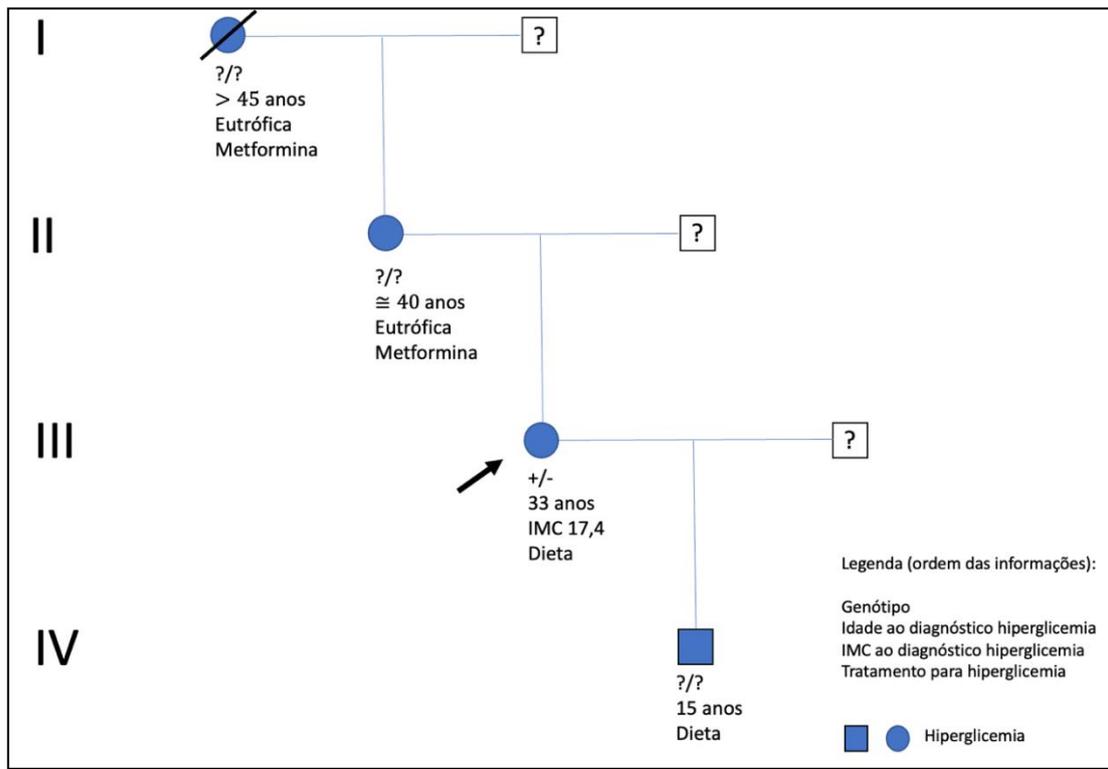
Figura 15 - Visualização pelo IGV da variante GCK(NM_000162.5):c.864-279_864-271del



O probando 1 é uma paciente do sexo feminino, 41 anos, nascida em São Paulo – SP, apresentou diagnóstico laboratorial de glicemias de jejum alteradas aos 33 anos em exames de rotina. Ao diagnóstico possuía glicemia de jejum de 112 mg/dL, HbA1c de 6,1% e baixo peso (IMC 17,4), sem tratamento farmacológico, pontuando 75,5% no *MODY calculator*. Perfil lipídico normal e anticorpos anti-célula beta (Anti-GAD, Anti- insulina e Anti-IA2) não reagentes, oito anos após o diagnóstico da hiperglicemia. Do ponto de vista familiar, Figura 16, mãe com diagnóstico de DM tipo 2 por volta dos 40 anos de idade, eutrófica e em tratamento com Metformina cuja avó materna tinha diagnóstico de hiperglicemia após os 45 anos de idade, eutrófica e faleceu aos 75 anos, mantendo bom controle glicêmico com medidas dietéticas (sem terapêutica farmacológica). O filho, sexo masculino, nasceu com 3150 g e 49 cm, hoje com 15 anos de idade, com *Z score* de peso = -2,7 e *Z score* IMC = -1,88, apresenta glicemia de jejum de 81 mg/dL e HbA1c 5,8%. Durante seguimento de 3 anos, a glicemia de jejum do filho variou de 86 a 107 mg/dL e HbA1c variou de 5,8 a 5,9%. A probando não recebeu tratamento farmacológico durante a gestação deste filho. O seguimento clínico da paciente apontou que ela continuou com baixo peso (IMC 16,4), apresentou na curva glicêmica com sobrecarga oral de 75 g de glicose com glicemia no início de 118 mg/dL e duas horas após de 179 mg/dL (incremento de 61), assim como, mantendo glicemia de jejum em torno de 110 mg/dL, com peptídeo C de 1,46 ng/dL e mantendo HbA1c compatível com pré-diabetes mellitus (6,2%). Durante todo o período de hiperglicemia entre 33 e 41 anos, a paciente permaneceu sem tratamento farmacológico para hiperglicemia, assim como seu filho. Do ponto de vista fenotípico, esta probando foi classificada como **pouco típica para MODY**, uma vez que a hiperglicemia foi diagnosticada após os 30 anos de idade, apesar de pontuar 75,5% pelo *MODY calculator*.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **variante de significado incerto** (PM2 *supporting*) no ACMG.

Figura 16 - Heredograma da família com variante intrônica **c.864-279_864-271del** no **GCK**

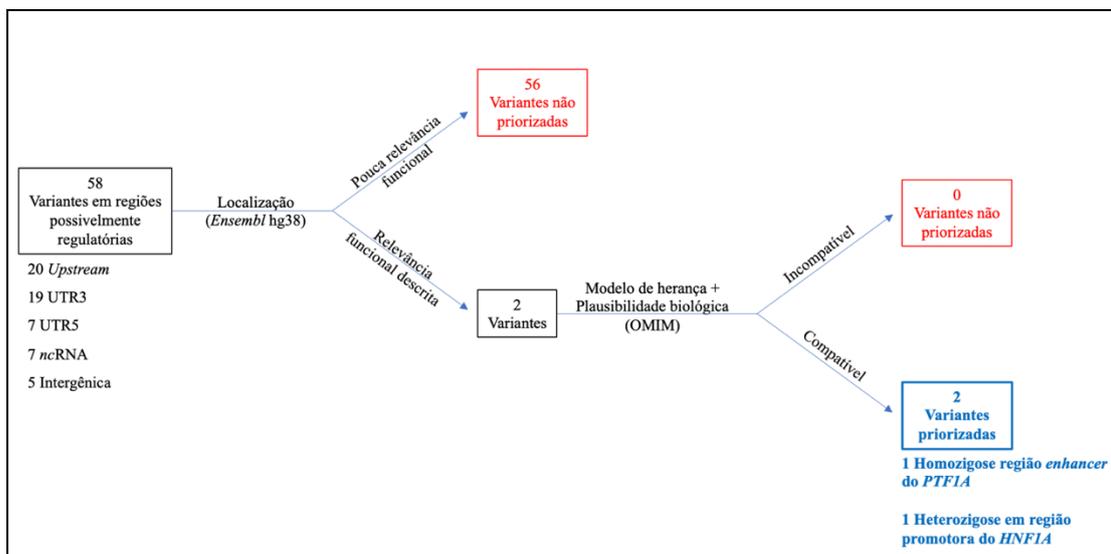


IMC: índice de massa corporal; **Seta negro:** Probando 1; **-/+** portador heterozigoto da variante

4.2.1.2 Variantes em regiões possivelmente regulatórias

Em relação às 58 variantes situadas em regiões possivelmente regulatórias (Upstream, UTR3, UTR5, ncRNA e intergênica), todas inicialmente foram avaliadas pelo buscador genômico *Ensembl* em sua versão para o hg38. Após essa análise, constatou-se que apenas duas dessas variantes estavam localizadas em uma região com descrição de importância regulatória. Além disso, essas duas variantes quando analisadas pelo banco de dados do OMIM, estavam em concordância em relação ao modelo de herança e plausibilidade biológica. Esse fluxograma de análise se encontra resumido na Figura 17. Este passo foi capaz de identificar duas variantes, uma em homozigose em região *enhancer* do gene *PTF1A* (probando 2) e outra em região *upstream* do gene *HNF1A* (probando 3).

Figura 17 - Fluxo de priorização de variantes nucleares em regiões possivelmente regulatórias

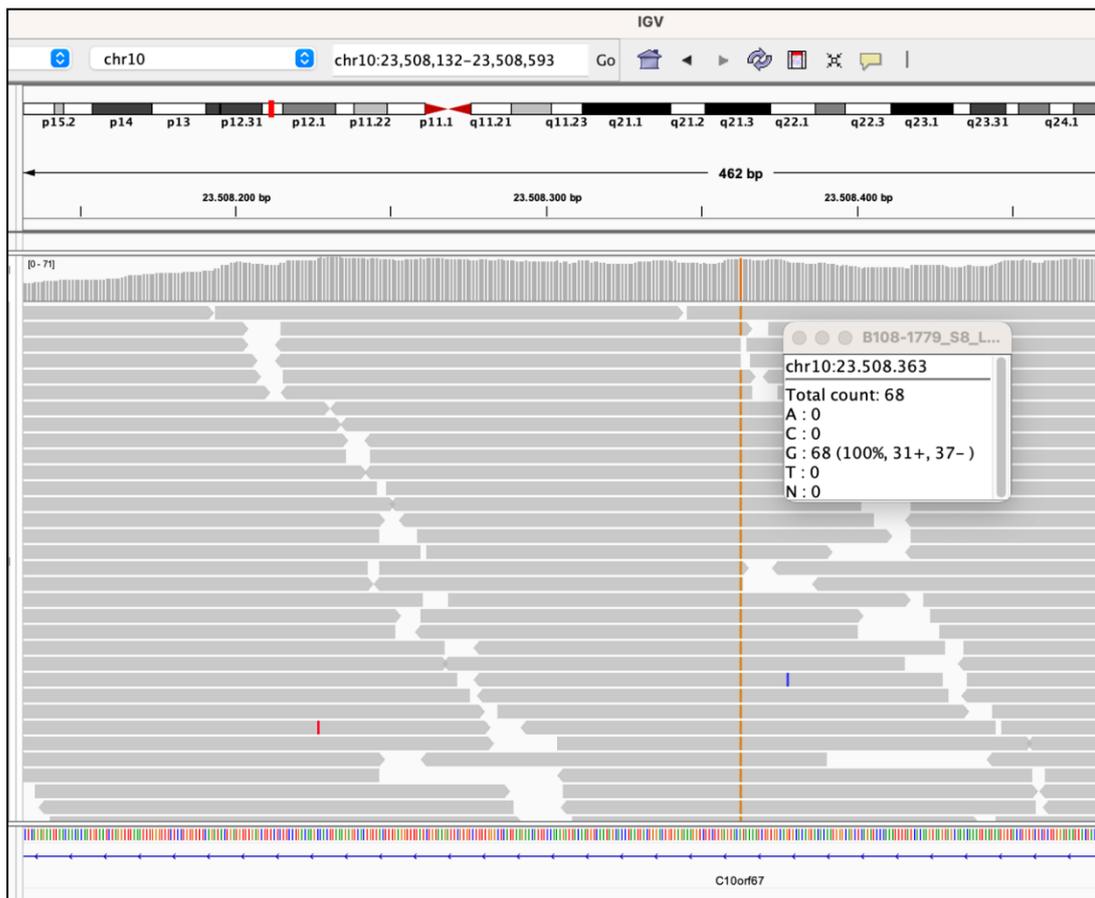


OMIM: *online mendelian inheritance in man*

Variante em região *enhancer* Chr10:23508363A>G do *PTF1A* – Probando 2

A primeira variante identificada foi a Chr10:23508363A>G, presente em homozigose. Ela está localizada em uma região intergênica, correspondente à região *enhancer* do *PFT1A* e distante 25 kb *downstream* deste. A cobertura alélica dessa variante foi considerada boa, com um balanço alélico de AF 100%/AO 68/DP 68 (Figura 18). Cabe ressaltar que essa variante não foi descrita em bancos populacionais como o gnomAD e o ABraOM.

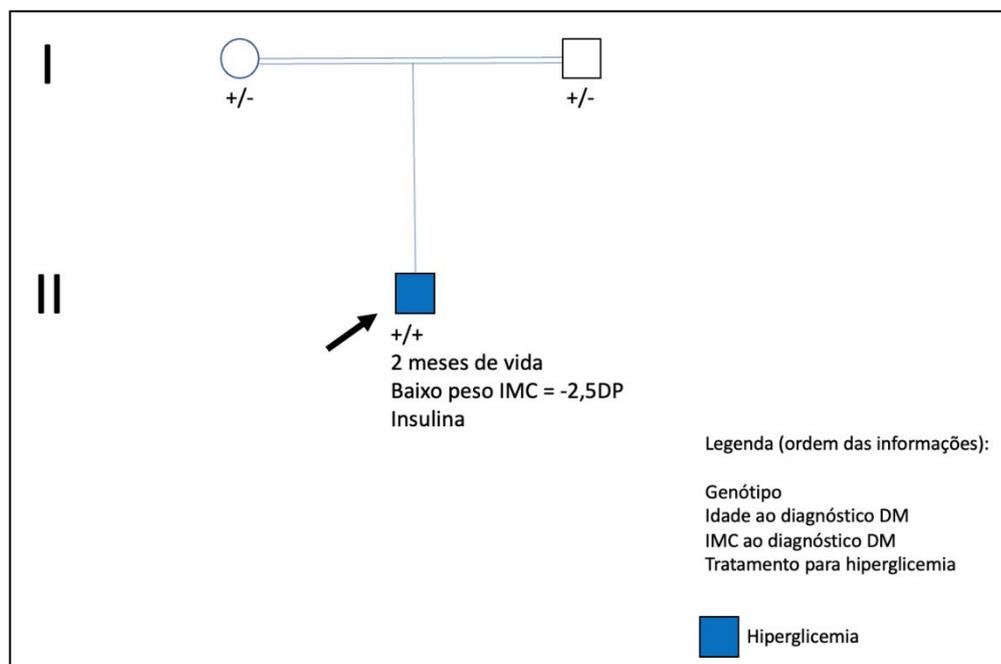
Figura 18 – Visualização pelo IGV da variante Chr10:23508363A>G em homozigose em região *enhancer* do *PTF1A*



O probando 2, sexo masculino, 6 anos, nascido em São Paulo-SP, filho de casamento consanguíneo, primos de primeiro grau (Figura 19) foi diagnosticado com DM ao primeiro mês de vida em exames para investigação de baixo peso ao nascimento (1330g). Ao diagnóstico de DM possuía uma glicemia de jejum de 340 mg/dL e HbA1c de 8,0%; anticorpos negativos (anti-GAD e anti-insulina). Durante seguimento apresentou, aos cinco meses, baixa estatura (59 cm de comprimento, -3DP do Z escore estatura/idade) e baixo peso (IMC de 14, -2,5DP do Z escore IMC/idade). Apresentou, também, insuficiência exócrina e a tomografia de abdome evidenciou pâncreas afilado e de difícil visualização. Foi diagnosticado com DM neonatal antes dos seis meses de vida. Foi iniciado tratamento com insulino terapia e reposição de enzimas pancreáticas. Possui pai e mãe saudáveis, sem histórico de DM. Este probando foi classificado como **fenótipo típico para DM neonatal** por ter sido diagnosticado com DM antes dos 6 meses de idade.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada no ACMG como **patogênica** (PM2 supporting + PM1 moderate + PP4 supporting + PS2 strong + PS3 strong).

Figura 19 - Heredograma da família com a variante **Chr10:23508363A>G** região *enhancer* do *PTF1A*

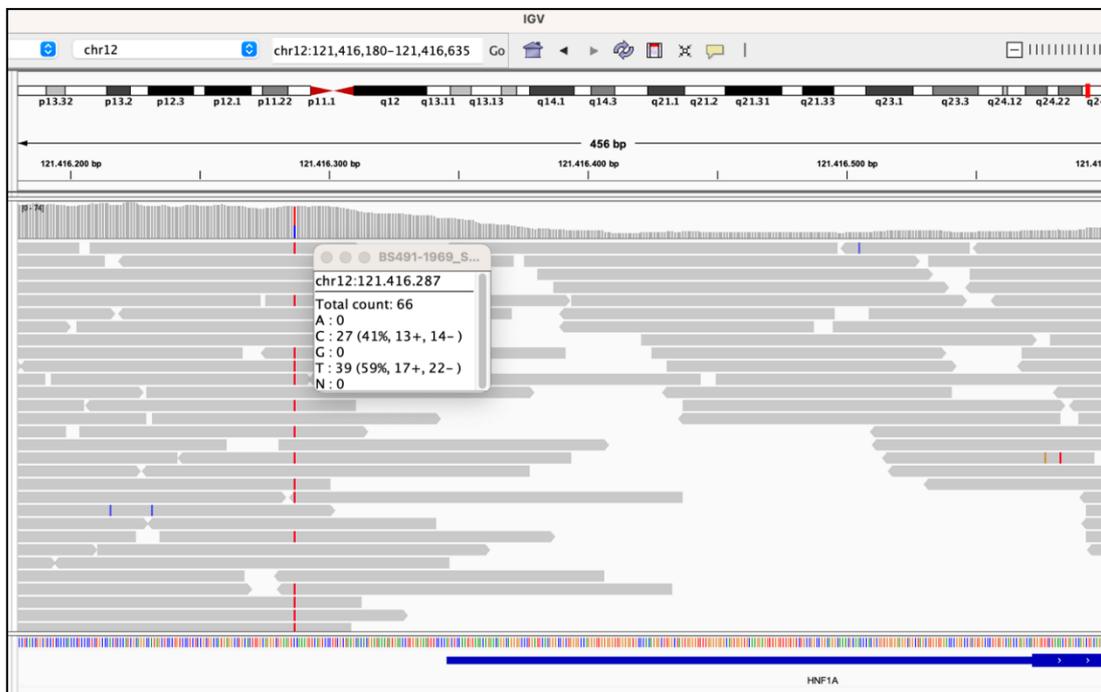


IMC: índice de massa corporal; **DP:** desvio padrão; **DM:** diabetes mellitus; **Seta negro:** Probando 2; +/- portador homocigoto da variante; +/- portador heterocigoto da variante

Variante em região *upstream* c.-285C>T no *HNFI1A* – Probando 3

A segunda variante em região regulatória foi a *HNFI1A* (NM_000545.6):c.-285C>T em heterozigose situada em região *upstream*. Essa região possui boa cobertura e balanço alélico AF 59%/AO 39/DP 66 (Figura 20). Sua frequência em bancos de dados populacionais (gnomAD ABraOM) é ausente. A variante se apresentou como, de novo, em segregação familiar (Figura 21).

Figura 20 - Visualização pelo IGV da variante *HNFI1A* (NM_000545.6):c.-285C>T em heterozigose



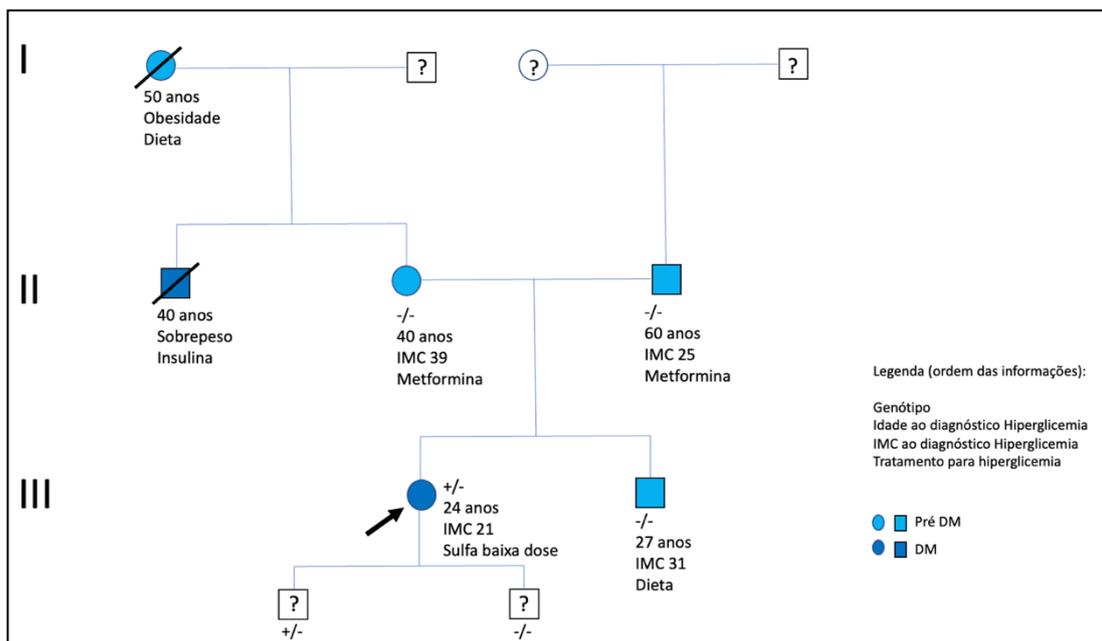
O probando 3, sexo feminino, 36 anos, nascida em Santo André – São Paulo. Diagnosticada com DM aos 24 anos de idade com IMC de 21, iniciou tratamento com antidiabéticos orais. Não possui registro de exames laboratoriais daquela época, mas relato de tentativas malsucedidas de controle glicêmico com metformina e vildagliptina, seguido de dapaglifozina. Aos 26 anos, após ser avaliada por endocrinologista, o tratamento foi modificado para glibenclamida (5 mg duas vezes ao dia) e metformina (500 mg uma vez ao dia): neste esquema apresentou hipoglicemias frequentes, o que dificultou o melhor controle glicêmico (perfil glicêmico laboratorial em 2016: glicemia de jejum: 189 mg/dL // HbA1c 9,2% // Peptídeo C 2,0 ng/mL // anti-GAD negativo). Aos 30 anos, foi suspensa a metformina e diminuída a dose de glibenclamida para meio comprimido (2,5 mg), duas vezes, com resolução dos episódios de hipoglicemia e melhora do controle glicêmico (exames laboratoriais de 2021: glicemia de jejum: 125 mg/dL // HbA1c 6,0% // peptídeo C 2,1 ng/mL). Este caso foi classificado como **fenótipo típico para MODY** uma vez que possui *MODY calculator* elevado (75,5%) e diagnóstico de DM antes dos 30 anos de idade.

Em relação ao histórico familiar (Figura 21), tem um irmão de 27 anos com diagnóstico de pré-DM aos 26 anos com IMC de 31, em tratamento, com mudanças de estilo de vida. Possui dois filhos do sexo masculino, um com 6 anos e outro com 3 anos, ainda sem investigação laboratorial para hiperglicemia. O pai de 65 anos, diagnosticado com pré-DM aos 60 anos, na época com peso “eutrófico”, mantém tratamento, desde então, com metformina. O pai possui histórico de tabagismo, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, infarto agudo do miocárdio e, atualmente, IMC de 25. A mãe de 54 anos, diagnosticada com pré-DM aos 40 anos em vigência de obesidade, iniciou tratamento com metformina. Atualmente possui IMC de 39 associado a *skin-tags* e acantose nigricante cervical grau 1 ao exame físico. A mãe relata que, aos 51 anos, quando perdeu peso e atingiu IMC de 28 anos, teve remissão do DM (normalização de HbA1c e glicemia de jejum) que logo retornou com o reganho de peso. O tio materno faleceu aos 53 anos, teve diagnóstico de DM aos 40 anos com sobrepeso quando foi indicado à insulino-terapia, porém não realizou o tratamento. Possuía história de etilismo, infarto agudo do miocárdio e tabagismo como comorbidades. A avó materna falecida teve diagnóstico de pré-DM aos 50 anos em

vigência de obesidade, não realizou tratamento farmacológico para hiperglicemia. Tanto o avô materno quanto os avós paternos não possuem histórico de DM.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **provavelmente patogênica** pelo ACMG (PM2 *supporting* + PM1 *moderate* + PP4 *moderate* + PM6 *moderate*).

Figura 21 – Heredograma da família com a variante **c.-285C>T** em região *upstream* do *HNF1A*

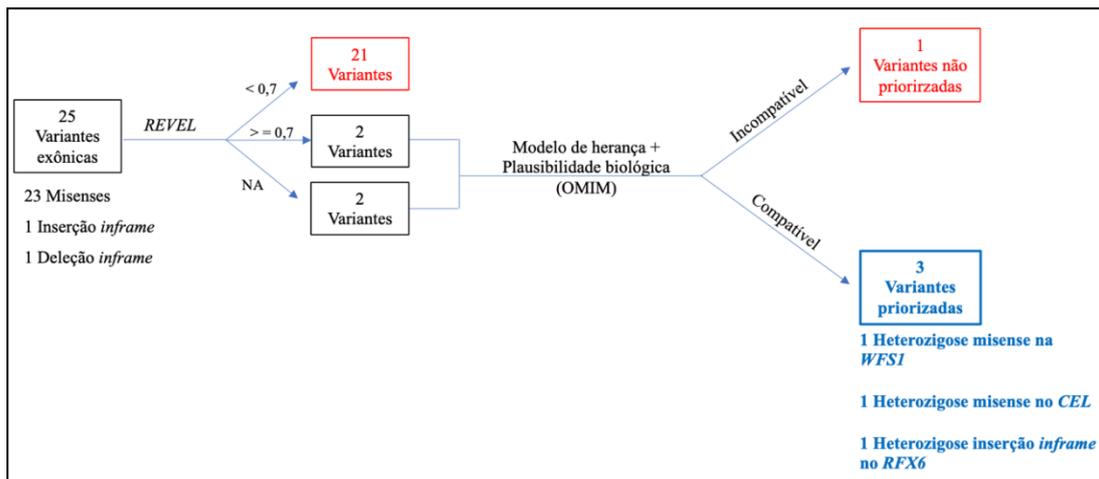


IMC: índice de massa corporal; **DM:** diabetes mellitus; **Seta negra:** Probando 3; -/- não carrega variante; +/- portador heterozigoto da variante

4.2.1.3 Variantes exônicas

Para avaliar as 25 variantes exônicas, sendo 23 (92%) missenses, 1 (4%) inserção *inframe* e 1 (4%) deleção *inframe*, foi utilizado o preditor *in sílico* REVEL (Figura 22). Este foi capaz de priorizar duas variantes com pontuação $\geq 0,7$, enquanto 21 variantes não foram priorizadas por apresentarem baixa pontuação ($< 0,7$) e duas, o preditor foi incapaz de calcular por se tratar de variantes do tipo inserção/deleção. Ao considerar a plausibilidade biológica e modelo de herança, foram priorizadas três variantes, incluindo as duas identificadas pelo REVEL e mais duas variantes do tipo inserção/deleção. Por fim, esta etapa foi capaz de identificar três variantes em heterozigose: uma missense no gene *WFS1* (probando 4), uma missense no gene *CEL* (probando 5) e uma inserção *inframe* no *RFX6* (probando 6).

Figura 22 – Fluxo de priorização de variantes nucleares exônicas

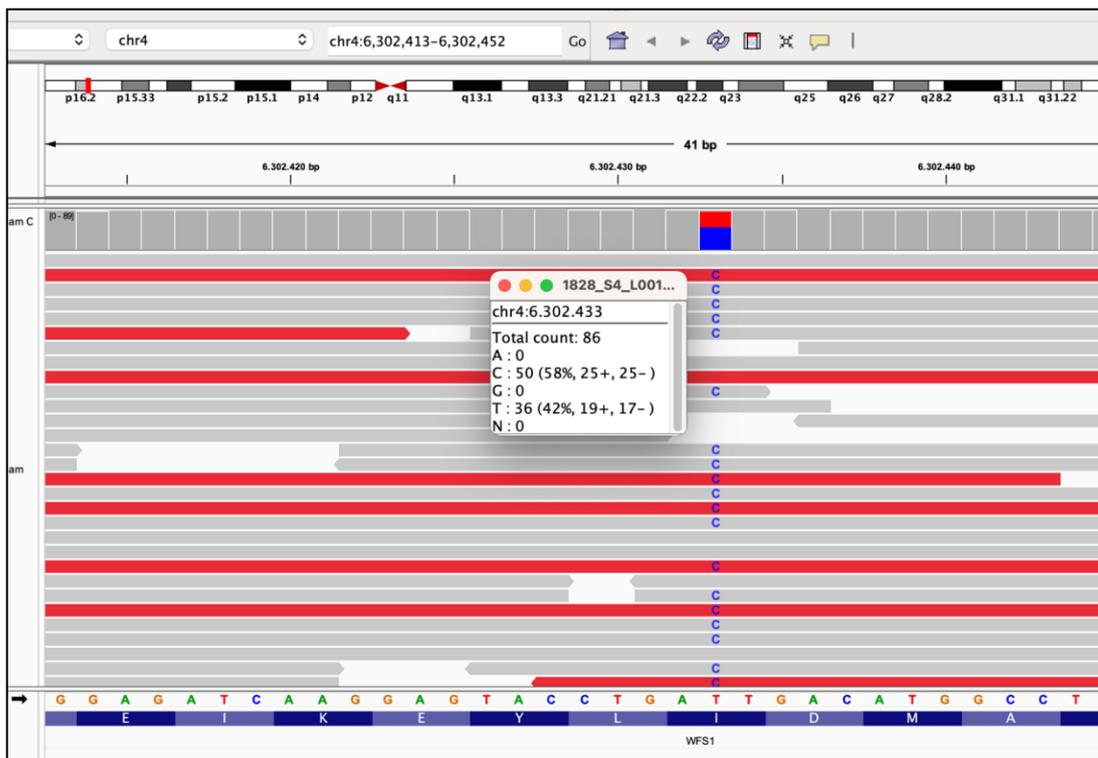


OMIM: *online mendelian inheritance in man*

Variante missense c.911T>C no *WFS1* – Probando 4

A primeira variante nuclear exônica priorizada foi a *WFS1*(NM_006005.3):c.911T>C (p.Ile304Thr), uma variante do tipo missense em heterozigose situada no exon 8. A região possui boa cobertura e balanço alélico AF 58%/AO 50/DP 86 (Figura 23). Sua frequência em bancos de dados populacionais é ausente no ABraOM e de 0.0008% no gnomAD além de pontuar 0,88 no predito *in silico* REVEL.

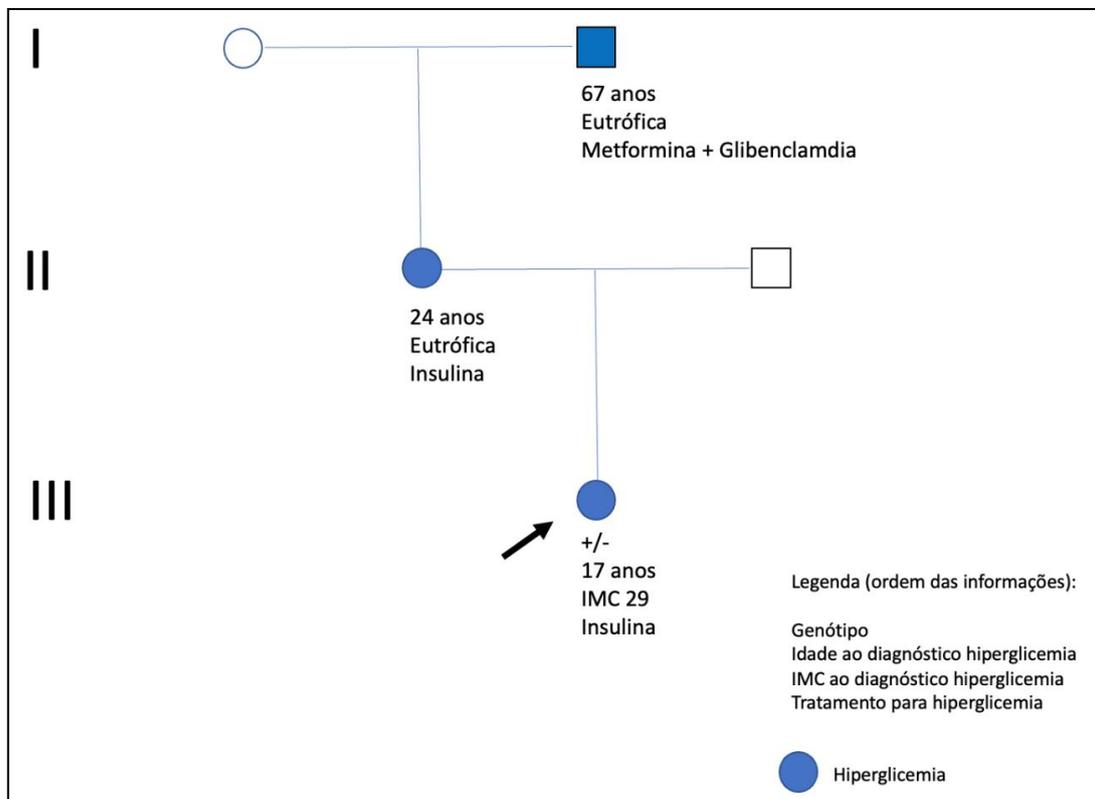
Figura 23 - Visualização pelo IGV da variante *WFS1*(NM_006005.3):c.911T>C (p.Ile304Thr) em heterozigose



O probando 4, sexo feminino, nascida em Pindoretama – Ceará, diagnosticada com DM aos 17 anos, em vigência de sobrepeso (IMC 29) e cetoacidose. Perfil glicêmico na época do diagnóstico: glicemia de jejum 271 mg/dL e HbA1c 9,0%. Anticorpo anti-GAD não reagente, perfil lipídico e renal normal. Iniciou tratamento com insulinoterapia por 4 meses, com melhora importante do controle glicêmico. Manteve sem tratamento farmacológico por 2 anos (até os 19 anos), mantendo bom controle glicêmico: glicemia de jejum 90 mg/dL, HbA1c 5,4%, peptídeo C 3,08 ng/dL, Cr 0,6 mg/dL. Esta história pontua 75,5% na ferramenta *MODY calculator* e, como paciente diagnosticada com DM antes dos 30 anos, foi classificada como **fenótipo típico para MODY**.

Do ponto de vista familiar (Figura 24), mãe diagnosticada com DM aos 24 anos, eutrófica, e desde então até os 47 anos sendo tratada com antidiabéticos orais (metformina e glibenclamida), quando evoluiu para necessidade de uso de insulina para melhora do controle glicêmico, até atualmente, com 49 anos. Avô paterno com diagnóstico de DM aos 67 anos, eutrófico, em tratamento com antidiabéticos orais (metformina e glibenclamida) até atualmente, com 69 anos.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **variante de significado incerto** (PM2 *supporting* + PP3 *supporting*) pelo ACMG.

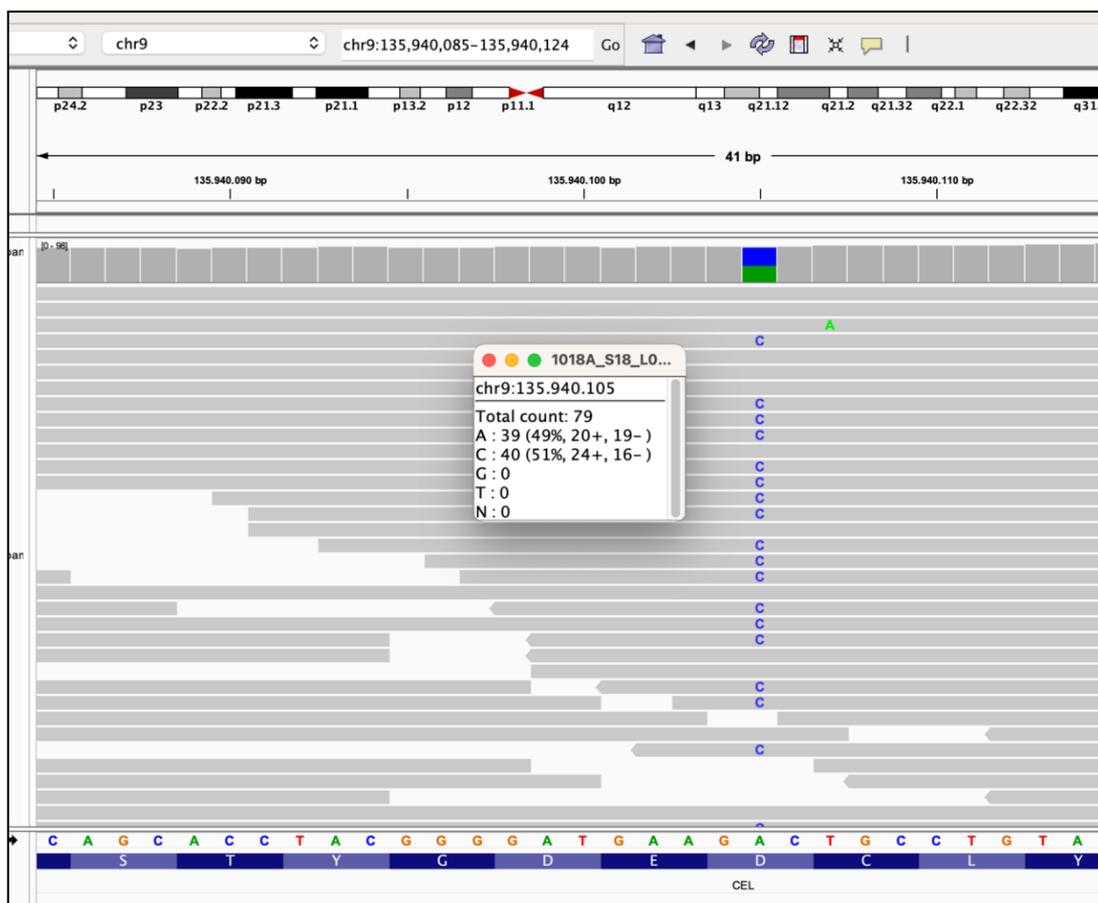
Figura 24 - Heredograma da família com a variante **missense c.911T>C** no **WFS1**

IMC: índice de massa corporal; **Seta negro:** Probando 4; +/- portador heterozigoto da variante

Variante missense c.296A>C no gene *CEL* – Probando 5

A segunda variante foi a *CEL* (NM_001807.6):c.296A>C (p.Asp99Ala), uma variante do tipo missense em heterozigose situada no exon 3. Possui boa cobertura e balanço alélico AF 51%/AO 40/DP79 (Figura 25). Sua frequência em bancos de dados populacionais é ausente no ABraOM e no gnomAD, além de pontuar 0,9 no preditor *insilico* REVEL.

Figura 25 Visualização pelo IGV da variante *CEL* (NM_001807.6):c.296A>C (p.Asp99Ala) em heterozigose



O probando 5, sexo masculino, nascimento em São Paulo-SP, foi diagnosticado com hiperglicemia leve compatível com Pré-DM (glicemia de jejum de 104 mg/dL, HbA1c 6,4% e teste de tolerância oral a 75 g glicose, iniciando com glicemia de 107 mg/dL e terminando no tempo de 2 horas com 134 mg/dL) aos 5 anos de idade, eutrófico, associado à dislipidemia. Anticorpos anti-células beta não reagentes (Anti-GAD, Anti-IA2 e Anti Insulina). Perfil lipídico aos 9 anos de idade apontou elevação importante do LDL (Colesterol total: 235 mg/dL; LDL 168 mg/dL; HDL 57 mg/dL; Triglicérides 57 mg/dL). Atualmente, aos 18 anos de idade, mantém eutrófico (IMC 22,4), circunferência abdominal normal de 79 cm, mantendo sem tratamento farmacológico para hiperglicemia compatível com pré-DM. Dos 5 aos 18 anos, a glicemia de jejum variou de 95 a 123 mg/dL, HbA1c de 5,6 a 6,1%, peptídeo C de 1,2 a 2,1 ng/dL, sem disfunção renal e tireoidiana. Adicionalmente, apresentou microalbuminúria confirmada em duas aferições (341,76 mg/g e 84,82 mg/g: razão entre albuminúria/creatinúria em amostra isolada de urina), mantendo ClCr > 90 ml/min/1,73 m², o que levou ao acompanhamento com Nefrologista e prescrição de losartana 12,5 mg/dia. Sem retinopatia diabética, elastase fecal normal (>200 mcg/g em amostra de fezes) e imagens de abdome (ultrassonografia e tomografia computadorizada) não identificaram alterações pancreáticas ou outras más formações. Em relação à dislipidemia, realiza acompanhamento regular com cardiologista em uso de rosuvastatina 20 mg, acrescido de ezetimibe 10 mg, mantendo LDL de 115 mg/dL. Sem eventos macro vasculares identificados em exames de rotina cardiológica (ecocardiograma, eletrocardiograma, ultrassonografia doppler de carótidas e vertebrais). Antes ao estudo por painel molecular de genes relacionados a DM monogênico, o gene *GCK* foi sequenciado pela metodologia Sanger sem identificação de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas. Este caso foi classificado como **fenótipo típico para MODY**, uma vez que hiperglicemia diagnosticada antes dos 30 anos de idade e *MODY calculator* pontuou 75,5%.

Do ponto de vista familiar (Figura 26), mãe (não possui a variante) diagnosticou pré-diabetes mellitus aos 47 anos em exames de rotina, eutrófica, sem tratamento farmacológico até os 59 anos, quando apresentou ganho de peso (atingiu IMC de 28), esteatose hepática e atingiu glicemia de jejum compatível com DM (150 mg/dL) pela primeira vez. Apresentou elastase fecal normal aos 53 anos e a tomografia

computadorizada de abdome também não identificou anormalidades pancreáticas e nem outras más formações abdominais. Durante seguimento, manteve função renal, tireoidiana normal, microalbuminúria negativa e sem complicações macrovasculares. Dislipidemia também foi diagnosticada de modo precoce aos 15 anos de idade e iniciou terapia com estatina aos 20 anos de idade em vigência de IMC de 22 normal. Apresentou dois eventos trombóticos venosos: um imediatamente após infecção por COVID aos 58 anos de idade e outro não relacionado ao COVID aos 59 anos de idade, estando em tratamento, desde então, com anticoagulante rivaroxabana. Mantém dislipidemia importante (LDL de 201 mg/dL) apesar do uso contínuo de rosuvastatina 20 mg (dose máxima). Pai possui DM e HbA1c de 10% dosada aos 45 anos, sem mais informações. Avó materna faleceu aos 78 anos e apresentava os seguintes diagnósticos: diabetes mellitus, obesidade, trombose venosa, insuficiência cardíaca congestiva e hipertensão arterial sistêmica.

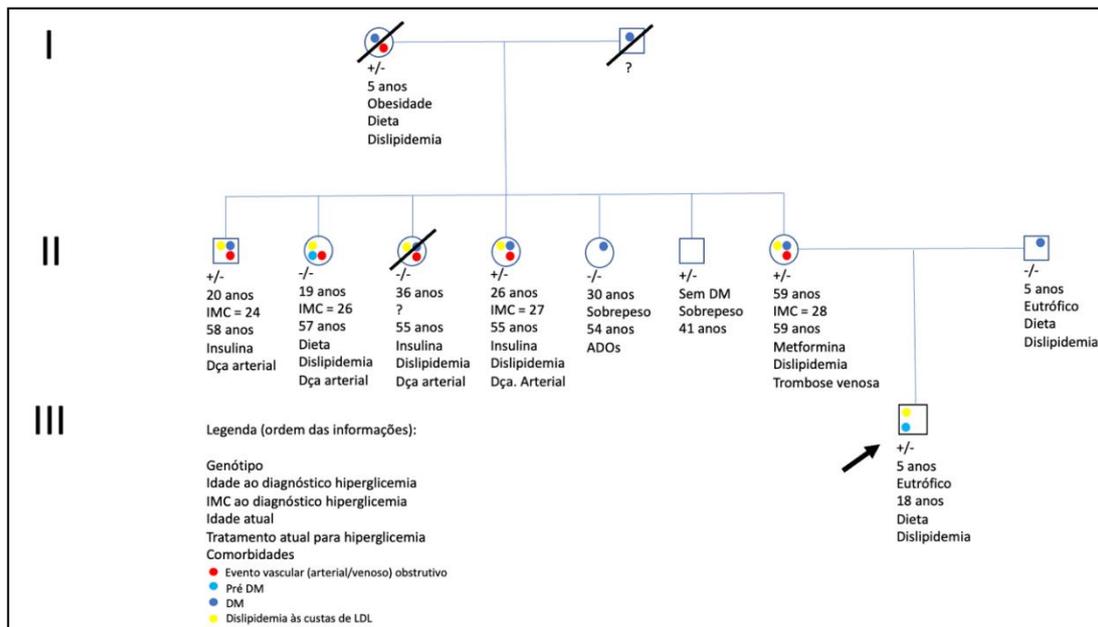
Probando 5 possui 4 tias maternas e 2 tios maternos. O primeiro tio materno (possui a variante) de 41 anos de idade, apresenta sobrepeso e esquizofrenia (não possui eventos tromboembólicos, nem cardiovasculares e nem DM). A primeira tia materna (não possui a variante), 54 anos de idade, apresenta obesidade (IMC=32), DM desde os 30 anos de idade em vigência de sobrepeso, sendo tratada desde então com ADOs, apresentando, hoje, descontrole glicêmico importante (HbA1c 12,6%) com provável necessidade de progressão para insulino-terapia. A segunda tia materna (possui a variante), com 55 anos de idade, sobrepeso (IMC=27), diagnosticada com DM aos 26 anos de idade (durante a segunda gestação), sendo tratada com ADOs (metformina + gliclazida) até os 53 anos, quando iniciou insulino-terapia basal (NPH somente). Esta possui elastase fecal reduzida (114 mcg/g, faixa normal > 200 mcg/g), neuropatia diabética (ClCr 49 ml/min/1,73 m² e microalbuminúria positiva >30 mg/g), esteatose hepática, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia (LDL de 73 mg/dL em uso de Atorvastatina 20 mg/dia), além de doença arterial oclusiva periférica em membros inferiores submetida a tratamento com angioplastia. A terceira tia materna (não possui a variante), com 55 anos de idade, diagnosticada com DM em uso de insulino-terapia, infarto agudo do miocárdico aos 36 anos, dislipidemia e faleceu de complicações relacionadas ao COVID aos 55 anos de idade. A quarta tia materna (não possui a variante), 57 anos de idade, sobrepeso (IMC=26), diagnosticada com pré-DM

e dislipidemia aos 19 anos durante gestação. Desde então em tratamento com ADOs e apresentou eventos isquêmicos vasculares arteriais cerebrais aos 56 anos. O segundo tio materno (possui a variante), 58 anos de idade, diagnosticado com DM desde 20 anos de idade. Atualmente em tratamento irregular com insulina, apresenta também dislipidemia, perda visual bilateral por retinopatia diabética, nefropatia diabética, doença arterial obstrutiva coronariana e de membros inferiores com necessidade de amputação de pododáctilos.

A segregação da variante identificada no probando 5 nestes familiares descritos está descrita no heredograma (Figura 26) desta família. A variante não foi capaz de segregar de forma concordante com nenhum fenótipo identificado nesta família: dislipidemia, DM, doença obstrutiva vascular arterial ou venosa.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **provavelmente benigna** (PM2 *supporting* + PP3 *supporting* + BP1 *supporting* + BS4 *strong*) pelo ACMG. Esta variante também tinha sido identificada como variante de significado incerto por estudos prévios de nosso grupo.

Figura 26 - Heredograma da família com a variante missense c.296A>C no *CEL*

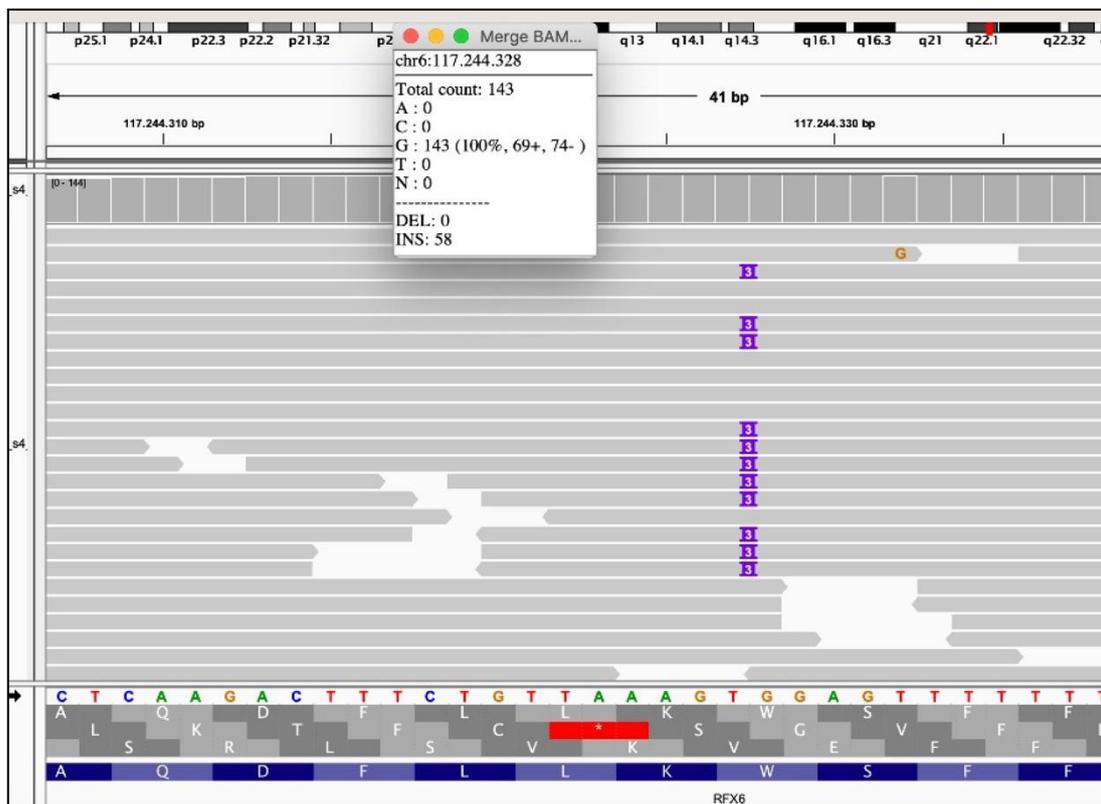


IMC: índice de massa corporal; **Dça arterial:** doença arterial; **DM:** diabetes mellitus; **ADOs:** antidiabéticos orais; **Seta negroito:** Probando 5; **-/-** não carrega variante; **+/-** portador heterozigoto da variante.

Variante inserção *inframe* c.1494_1495insGGA no *RFX6* – Probando 6

A terceira variante foi a *RFX6* (NM_173560.4):c.1494_1495insGGA (p.Lys498_Trp499insGly), uma variante do tipo inserção *inframe* em heterozigose situada no exon 14. Possui boa cobertura e balanço alélico AF 40%/AO 58/DP143 (Figura 27). Sua frequência em bancos de dados populacionais é ausente no ABraOM e no gnomAD.

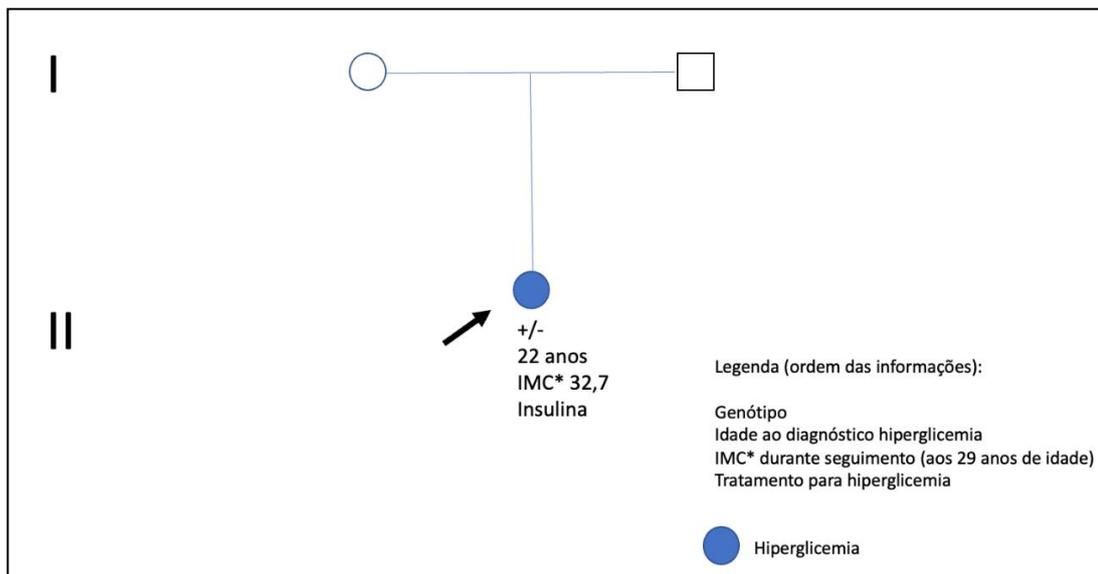
Figura 27 Visualização pelo IGV da variante *RFX6* (NM_173560.4): c.1494_1495insGGA (p.Lys498_Trp499insGly) em heterozigose



O probando 6, sexo feminino, 31 anos de idade, nascimento em São Paulo capital, foi diagnosticada com DM aos 22 anos, em exames de rotina, em insulino terapia, desde diagnóstico para a hiperglicemia. Aos 29 anos apresentou peptídeo C de 0,7 ng/dL em vigência de função renal normal e glicemia de jejum de 290 mg/dL. Atualmente, mantém tratamento em insulino terapia dose plena (0,48 UI/kg/dia), em esquema basal bolus, associado à dislipidemia (em uso de atorvastatina 10 mg/dia), sem complicações micro ou macrovasculares, com obesidade (IMC =32,7). Além disso, apresentou peptídeo C aos 42 anos de 0,94 ng/dL, Cr 0,78 mg/dL e HbA1c 7,8%. Probando 6 foi classificado como fenótipo **pouco típico para MODY**, pois, apesar de ter sido diagnosticada com DM jovem, aos 22 anos, por ter iniciado e mantido insulino terapia desde o diagnóstico, pontuou baixo com 1,9% pela ferramenta *MODY calculator*. Paciente não possui histórico familiar de DM (**Figura 28**).

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **variante de significado incerto** (PM2 *supporting* + BP3 *supporting*) pelo ACMG.

Figura 28 - Heredograma da família com a variante **inserção *inframe* c.1494_1495insGGA no *RFX6***



IMC: índice de massa corporal; **Seta negro:** Probando 6; **-/-** não carrega variante; **-/+** portador heterozigoto da variante

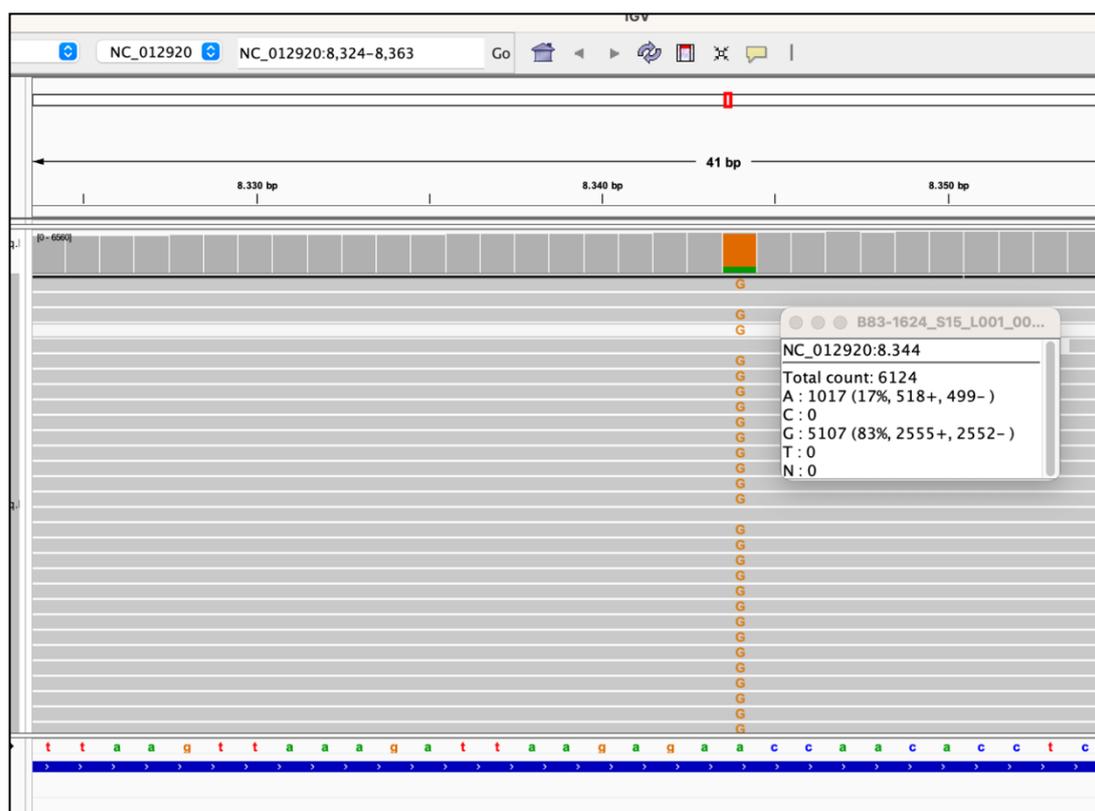
4.2.2 Priorização alélica de variantes mitocondriais

Ao todo, 5305 variantes mitocondriais foram identificadas pelo tNGS, uma média de 41 variantes por paciente, muitas delas únicas e, portanto, privadas em alguns indivíduos e outras comuns a muitos da coorte (até 100 indivíduos apresentando a mesma variante). A pesquisa pelo banco de dados público MITOMAP - <https://mitomap.org/MITOMAP/ConfirmedMutations>) identificou 95 variantes com patogenicidade confirmada. Dentre elas, a variante na posição m.8344A>G foi detectada em nossa coorte no probando 7.

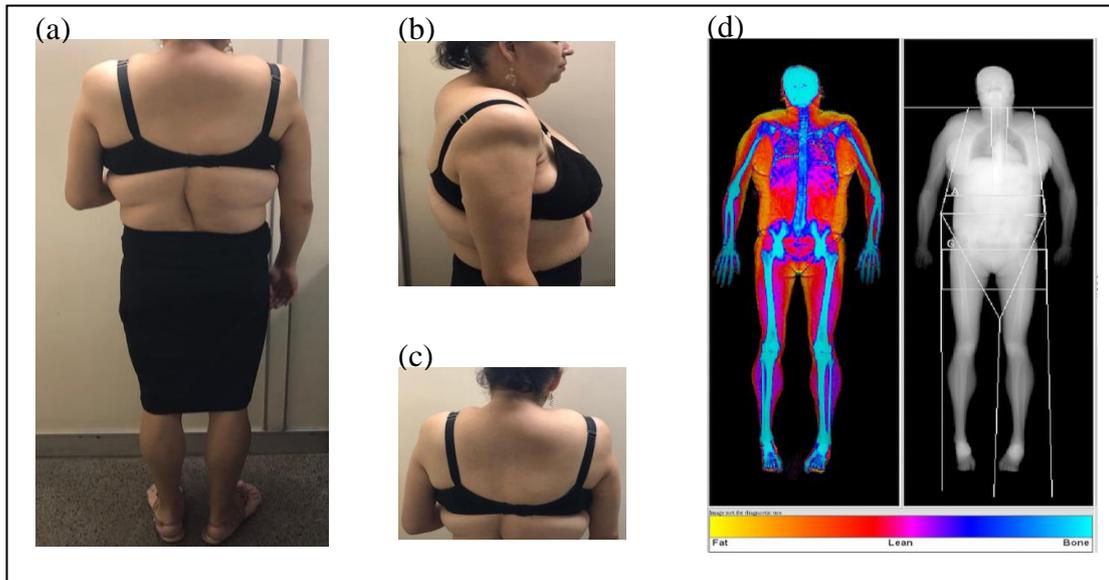
Variante mitocondrial m.8344A>G no gene *MTTK* – Probando 7

A variante mitocondrial m.8344A>G / tRNA (Lys) foi identificada em 83% de heteroplasmia, sendo a proporção alelo selvagem/alelo mutado de 1017/5107 (Figura 29), respectivamente. Pelo MITOMAP¹⁶⁴, possui frequência em bancos populacionais mitocondriais (*GeneBank Mitomap*) de 0,007%. Existem 147 referências bibliográficas, citando esta variante como associada aos fenótipos MERRF (*Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers*), humor depressivo, leucoencefalomalácia, DM, surdez neurosensorial, lipomatose múltipla sistêmica, entre outros. Classificada como patogênica (patogenicidade confirmada) pelo preditor *in silico* MitoTIP.

Figura 29 - Visualização pelo IGV da variante mitocondrial m.8344A>G / tRNA (Lys)



Probando 7, sexo feminino, 38 anos, nascida em Adamantina, São Paulo. Entre os 10 e 15 anos de idade relata ter notado distribuição anômala de gordura, com presença de giba cervical e preenchimento de fossas supraclaviculares (Figuras 30a, b e c); aos 18 anos apresentou sinais de resistência insulínica (hirsutismo facial, ciclos menstruais regulares e alopecia androgênica). Aos 25 anos foi diagnosticado carcinoma papilífero de tireoide e, aos 28 anos, DM com IMC normal. Desde então evoluiu com dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica, em uso de insulinoterapia (1,2 UI/kg/dia), antidiabéticos orais (pioglitazona e metformina) e hipolipemiantes (atorvastatina e benzofibrato). Durante seguimento, apresentou também diagnóstico de Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e depressão. A densitometria de corpo inteiro realizada aos 32 anos aponta: 1-gordura total 17.1kg (29%); 2- FMR (*Fat Mass Ratio*, relação entre a gordura em tronco sobre membros inferiores) de 2,15. Imagens do *Fat Shadow* (Figura 30d) mostram uma escassez de gordura em extremidades, especialmente nos membros inferiores em detrimento de acúmulo de gordura truncal; 3%- 16,6% de gordura em membros inferiores; 4%- 32,7% de gordura em tronco. Em avaliação multidisciplinar, com outras especialidades médicas (otorrinolaringologia, neurologia, cardiologia) foram feitos os seguintes diagnósticos: perda auditiva neurossensorial moderada, miopatia proximal, fadiga, comprometimento intelectual, ataxia sensorial, anormalidades cardíacas e biópsia muscular compatível com doença mitocondrial. Pelo baixo percentual de gordura em membros inferiores, esse probando foi classificado como **fenótipo típico para LPD parcial familiar.**

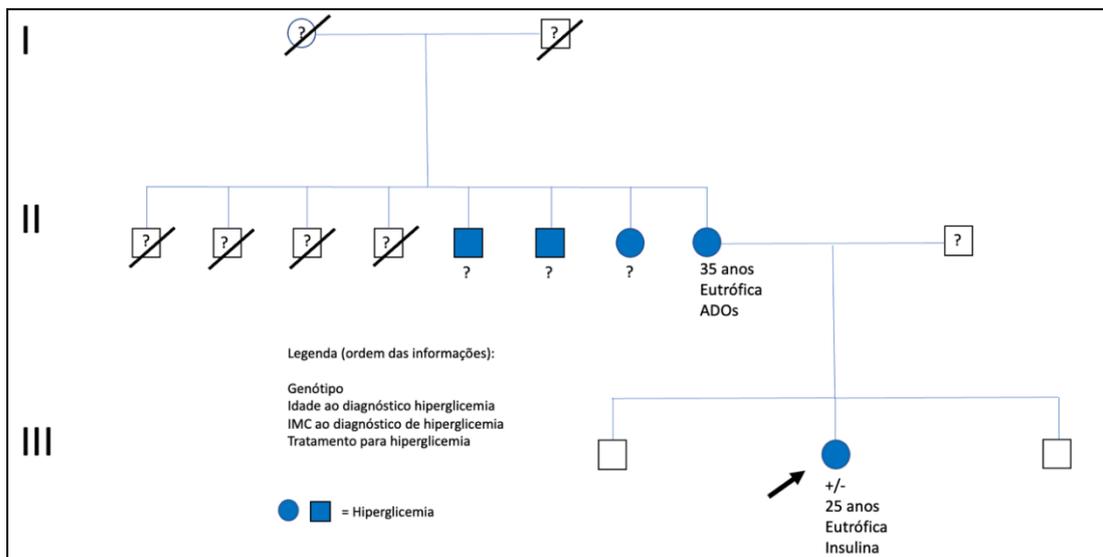
Figura 30 - Padrão de distribuição de gordura do probando 7

(a) Aparente distribuição predominantemente troncual de gordura, com pouco tecido subcutâneo em membros inferiores. (b) Presença de giba em região cervical, aparente ausência de gordura em membro superior direito. (c) Presença de gordura em região troncual, preferencial em região de ombros (mais proeminente à direita). (d) Imagem (*Fat Shadow*) derivada da densitometria, gerada por software específico que tem como objetivo visualizar a constituição corpórea, especialmente útil para quantificação de gordura ¹⁷⁰: evidencia, visualmente, uma perda de gordura em extremidades, em detrimento do acúmulo de gordura em região troncual. Espectro de cores representando a densidade dos tecidos (amarelo=gordura; vermelho, roxo=músculo; azul=osso).

Do ponto de vista familiar, pais não consanguíneos, mãe com diagnóstico de DM aos 35 anos durante gestação, hoje com 65 anos, e indicação de insulino terapia por descontrole glicêmico, mas mantém tratamento com antidiabéticos orais. História paterna desconhecida. Ao todo, 7 tios maternos, sendo 4 falecidos sem detalhes da histórica clínica e outros 2 tios maternos e 1 tia materna, hoje com idade maior que 70 anos (sem precisão deste dado), todos com DM, sendo os dois tios em uso de insulina e tia em uso de antidiabéticos orais. Probando 7 possui dois irmãos, sem DM, um com 30 anos e outro com 47 anos (Figura 31).

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada pelo ACMG, adaptado para variantes mitocondriais como **provavelmente patogênica** (PS4strong + PP1moderate + PS3supporting + PM2supporting + PP3supporting).

Figura 31 - Heredograma da família com a variante mitocondrial **m.8344A>G** no **MTTK**



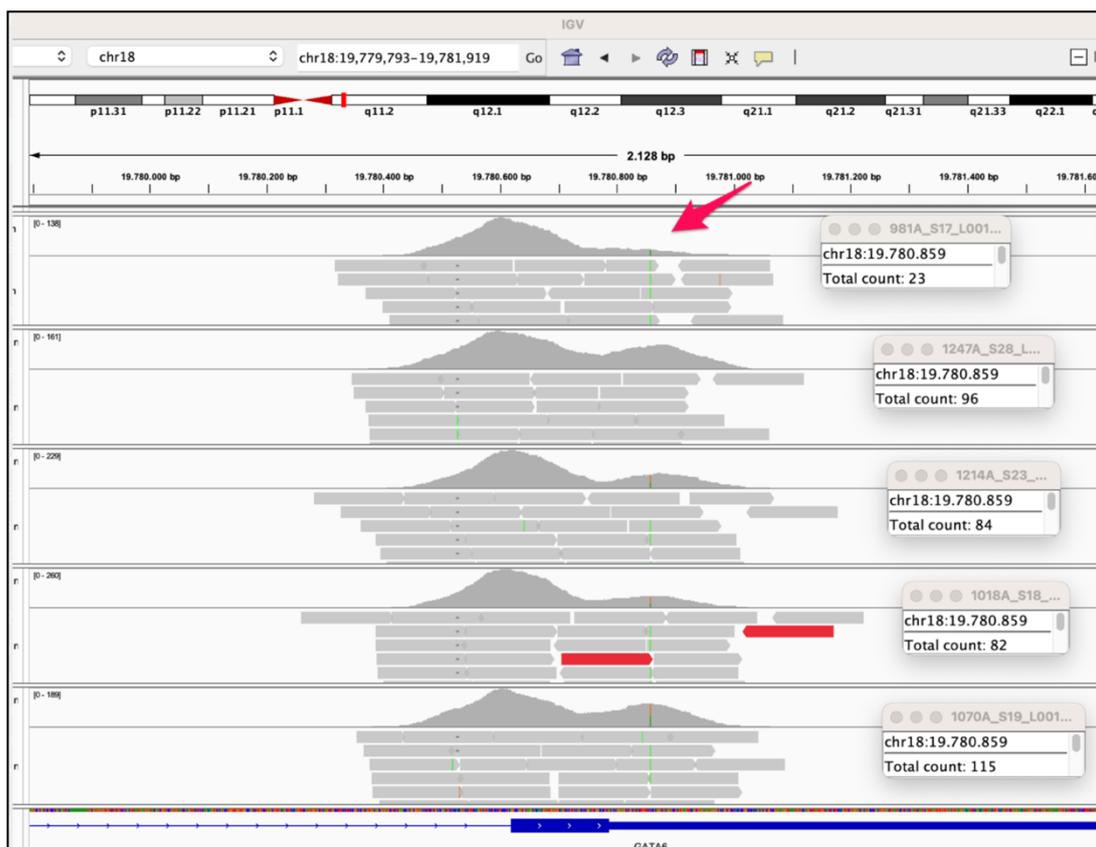
4.2.3 Priorização de variação do número de cópias nucleares e mitocondriais

A pesquisa de variantes do tipo CNVs não identificou nenhuma variante mitocondrial desta categoria e revelou uma variante nuclear no gene *GATA6*.

Variante tipo CNV Chr18:g.19780797_19780917del no *GATA6* – Probando 8

O software CONTRA foi capaz de identificar uma deleção de 121 pares de base, acometendo a região 3' UTR do *GATA6* Chr18:g.19780797_19780917del ($\log_{10} \text{ratio} = -1,34$ e valor $p = 0,009$). A Figura 32 ilustra a visualização desta região com menor cobertura pelo IGV de forma comparativa com outros indivíduos da mesma corrida. A título de comparação para uma análise quantitativa da queda de cobertura, foi exposta (destacados em quadrados menores) a cobertura de uma região pontual dentro da deleção identificada (em média ocorreu uma queda na cobertura de 4 vezes).

Figura 32 - Visualização pelo IGV da variante no *GATA6*: Chr18:g.19780797_19780917del



Seta vermelha: indica local de menor cobertura no probando 8.

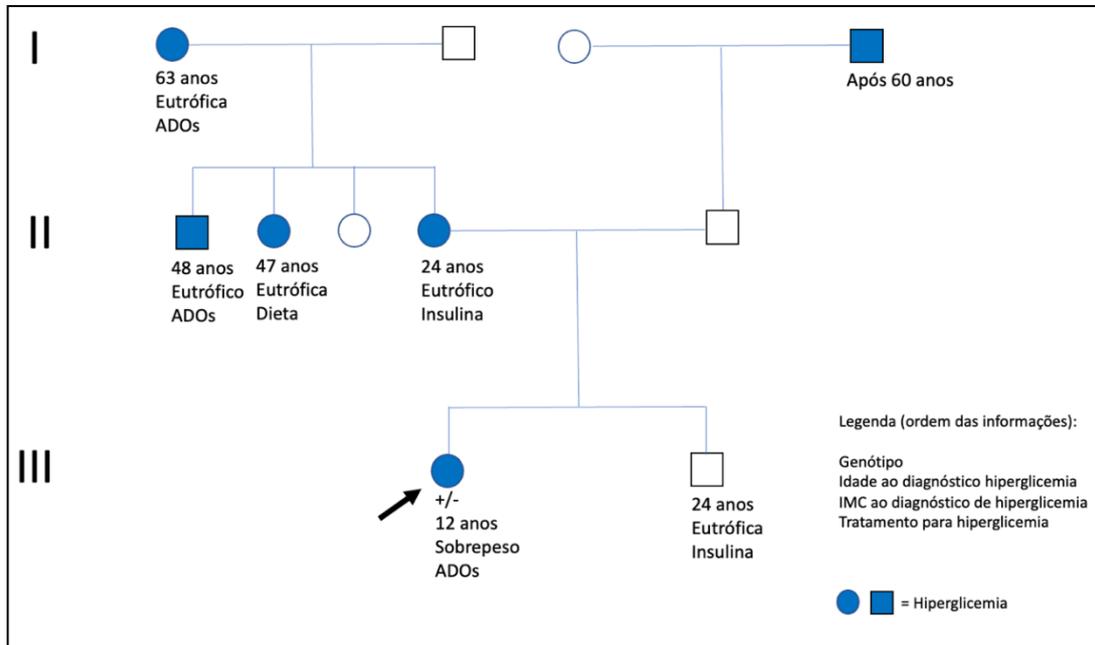
O probando 8, sexo feminino, 23 anos, nascida em São Paulo – SP, apresentou diagnóstico de DM aos 12 anos de idade em vigência de sobrepeso (IMC=21,8; \geq p85 e $<$ p97 de IMC para idade), assintomática em exames de rotina. Naquela época, apresentou glicemia de jejum e 99 mg/dL, HbA1c de 6,9%, além de rastreios para autoimunidade relacionados à célula beta pancreática negativos (anti-GAD, anti-IA2 e anti-insulina), função renal e perfil lipídico normal. Nesta época, o teste de tolerância oral com 75 g de glicose evidenciou glicemia de jejum de 140 mg/dL e no tempo 2 horas de 271 mg/dL (incremento de 131 mg/dL). Foi iniciado tratamento com aconselhamento dietético por um ano. No período dos 13 anos aos 16 anos de idade, com IMC compatível com eutrófico, probando utilizou gliclazida de forma irregular com doses variadas (entre 15 mg/dia e 30 mg/dia), sem eventos de hipoglicemia, mantendo HbA1c entre 5,3% até 6,1%, glicemias de jejum entre 91 mg/dL até 126 mg/dL e peptídeo C entre 1,3 ng/dL e 2,8 ng/dL. Aos 17 anos, interrompeu o tratamento farmacológico por um ano, manteve HbA1c entre 6,1% até 6,9%, glicemias de jejum entre 106 mg/dL até 110 mg/dL e peptídeo C entre 2,2 ng/dL e 2,3 ng/dL. Dos 18 aos 19 anos, reintroduziu gliclazida (até 30 mg), sem eventos de hipoglicemia relatados e manteve HbA1c entre 6,2% até 6,9%, glicemias de jejum entre 135 mg/dL até 145 mg/dL e peptídeo C de 2,0 ng/dL. Dos 19 anos até os 21 anos suspendeu tratamento farmacológico e manteve HbA1c entre 6,2% até 6,8%, glicemias de jejum entre 120 mg/dL até 121 mg/dL e peptídeo C entre 1,99 ng/dL e 2,34 ng/dL. Durante todo o acompanhamento, dos 12 aos 22 anos, probando apresentou IMC normal, função renal normal, sem complicações microvasculares relacionadas ao DM (fundo de olho normal e microalbuminúrica negativa) e sem dislipidemia. Aos 23 anos, ao término do seguimento clínico, por questões pessoais, o probando 8 piorou estilo de vida (interrompeu atividade física e ganhou peso, atingindo IMC de 26,6 compatível com sobrepeso), quando passou a apresentar sintomas de hiperglicemia franca (poliúria e polidipsia). Neste momento, foi repetido perfil glicêmico que diagnosticou DM em franca descompensação: glicemia de jejum de 239 mg/dL; HbA1c de 8,9%; peptídeo C de 1,3 ng/dL; TTOG com glicemia basal de 231 mg/dL e no tempo 2 horas de 374 mg/dL), sendo então iniciada terapêutica farmacológica com ADOs (metformina e gliclazida). Pela baixa idade ao diagnóstico de hiperglicemia (aos 12

anos) e elevada pontuação no *MODY calculator* (75,5%), o probando 8 foi classificado como tendo **fenótipo típico para MODY**.

Do ponto de vista familiar (Figura 33), o probando possui um irmão de 29 anos de idade e pai de 57 anos de idade, ambos eutróficos sem DM. Mãe de 54 anos, com diagnóstico de DM aos 24 anos durante a gestação, sem história de sobrepeso, durante evolução apresentou retinopatia DM e neuropatia DM, além de tratamento com insulinoterapia em dose plena (1,1 UI/ kg/dia) e peptídeo C, mantendo positivo após 15 anos de história de DM. Tio materno, 57 anos de idade, com DM diagnosticado aos 48 anos, eutrófico, com sintomas de polis (poliúria e polidipsia), iniciou tratamento com insulinoterapia trocada atualmente por sulfoniureia, além de desenvolver retinopatia DM. Tia materna de 50 anos, eutrófica, com glicemia de jejum alterada, diagnosticada aos 47 anos de idade, mantém tratamento somente com orientações nutricionais. Tia materna de 42 anos de idade, eutrófica, sem DM. Avó materna de 68 anos de idade, eutrófica, diagnosticou DM aos 63 anos de idade e realiza tratamento com metformina desde então. Avó paterna sem DM e avô paterno com diagnóstico de DM após os 60 anos de idade.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **variante de significado incerto** pela pontuação -0,3 (1B+ 4C + 5F).

Figura 33 - Heredograma da família com variante nuclear tipo CNV **Chr18:g.19780797_19780917del** no **GATA6**



IMC: índice de massa corporal; **ADOs:** antidiabéticos orais; **Seta negro:** Probando 8.

4.2.4 Variantes de significado incerto (VUS)

Ao todo, 5 pacientes possuíam uma variante de significado incerto identificada por processos investigativos anteriores ao atual da reanálise, as quais se encontram resumidas na Tabela 9. Uma delas, identificada no probando 5, já foi descrita anteriormente, pois as etapas de filtragem do atual estudo também identificaram essa mesma variante e, portanto, não será abordado novamente nesta sessão.

Variante missense c.17G>A no *INS* – Probando 9

A primeira variante foi a *INS* (NM_000207.3):c.17G>A (p.Arg6His), uma variante do tipo missense em heterozigose situada no exon 1. Possui boa cobertura e balanço alélico AF 50%/AO 50/DP 100. Sua frequência em bancos de dados populacionais é 0,0427% no ABraOM e de 0.0086% no gnomAD, além de pontuar 0,59 no predito *insilico* REVEL.

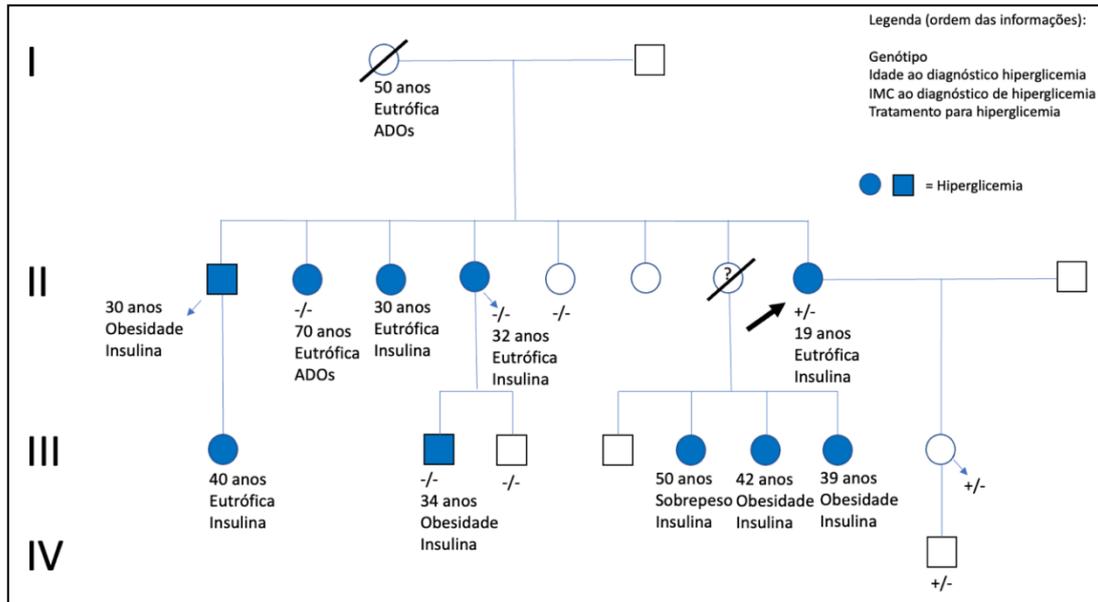
Probando 9, sexo feminino, 67 anos, foi diagnosticada com DM aos 19 anos, eutrófica em vigência de poliúria, polidipsia e perda de peso, sem cetoacidose. Iniciou tratamento na época com sulfoniureia (clorpropamida) por 10 anos. Aos 29 anos iniciou insulino terapia durante gestação da primeira filha. Durante todo seguimento apresentou dificuldade em manter boa adesão ao tratamento do DM. Atualmente, com IMC de 28, apresenta dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, retinopatia diabética proliferativa, polineuropatia periférica diabética, doença renal crônica (ClCr CKD-EPI 20.0 mL.min.1.73m² e albuminúria de 2658,2 mg/g) e doença arterial periférica obstrutiva. Em uso de: insulina basal bolus com NPH e aspart (0,64 UI/kg/dia), atorvastatina, anlodipino, furosemida, caverdilol, hidralazina, aspirina, gabapentina e losartana. Este probando foi classificado como **fenótipo típico para MODY** pela idade ao diagnóstico de DM aos 19 anos e pontuação no *MODY calculator* de 75,5%.

Do ponto de vista familiar (Figura 34), mãe falecida aos 72 anos por neoplasia de esôfago, teve diagnóstico de DM aos 50 anos, eutrófica, cujo tratamento sempre foi com ADOs. Pai sem histórico de DM. Possui 1 filha de 36 anos sem DM, cujo neto tem 7 anos, com obesidade e sem DM. Possui 6 irmãs e 1 irmão. O irmão diagnosticou

DM aos 30 anos, em vigência de obesidade e sempre tratou com insulina até o falecimento aos 77 anos, por neoplasia de estômago. Esse irmão possui uma filha de 50 anos, que teve diagnóstico de DM aos 45 anos, eutrófica e sempre em uso de insulina. A primeira irmã faleceu aos 50 anos, sem mais detalhes sobre histórico médico. Esta irmã possui 4 filhos, três com DM diagnosticadas por volta dos 40 anos, todas em uso de insulina, sendo duas com obesidade e uma com sobrepeso. O outro filho tem 39 anos, eutrófico e não tem DM. A segunda irmã, 66 anos, sem diagnóstico de DM. A terceira irmã tem hoje 68 anos, sem diagnóstico de DM. A quarta irmã, 70 anos de idade, teve diagnóstico de DM aos 32 anos, eutrófica e assim se mantém sempre em uso de insulino terapia. Essa irmã possui dois filhos com obesidade, sendo um com diagnóstico de DM aos 34 anos (atualmente com 38 anos) em uso de insulina e o outro tem hoje 30 anos, sem DM. A quinta irmã, faleceu aos 70 anos de neoplasia de estômago, teve diagnóstico de DM aos 30 anos, eutrófica, sempre em uso de insulina. A sexta irmã, 80 anos, diagnosticou DM aos 70 anos, eutrófica em tratamento com metformina.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **benigna** (BA1*very strong*).

Figura 34 - Heredograma da família com a variante nuclear **missense c.17G>A** no **INS**



IMC: índice de massa corporal; **ADOs:** antidiabéticos orais; **Seta negro:** Probando 9; **-/-** não carrega variante; **-/+** portador heterozigoto da variante.

Variante missense c.226G>T no *HNF1B* – Probando 10

A segunda variante foi a *HNF1B* (NM_000458.4):c.226G>T (p.Gly76Cys), uma variante do tipo missense em heterozigose situada no exon 1. Possui boa cobertura e balanço alélico AF 46%/AO 35/DP 76. Sua frequência em bancos de dados populacionais é 0,4105% no ABraOM e de 0,055% no gnomAD, além de pontuar 0,92 no predito *in silico* REVEL.

Probando 10, sexo masculino, nascimento em Santo Antonio do Retiro – MG, 49 anos de idade, foi diagnosticado com DM aos 34 anos, eutrófico em exames de rotina. Em tratamento durante todo o seguimento com ADOs (metformina + dapaglifozina + gliclazida) e mantendo bom controle glicêmico (HbA1c 7,4%; glicemia 147 mg/dL; peptídeo C 2,29 ng/ml, com função renal normal, e IMC de 23,7 (eutrófico). Em paralelo, possui pâncreas de dimensões reduzidas, inespecífico, e vias

urinárias normais à tomografia de abdome. Este fenótipo foi classificado como **pouco típico para MODY** pela idade ao diagnóstico de DM aos 34 anos e pontuação na *MODY calculator* de 4,5%.

Do ponto de vista familiar, as informações coletadas em dados de prontuário são vagas e são as seguintes: pai sem DM e tio paterno eutrófico com DM falecido. Tia paterna com obesidade e diagnóstico de DM “tardio” com 5 filhos obesos diagnosticados com DM em “idade jovem” em tratamento com ADOs. Possui dois filhos, um com 5 e outro com 29 eutróficos e sem DM.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **benigna** (BA1 *stand alone*).

Variante missense c.664G>A no *PDX1* – Probando 11

A terceira variante foi a *PDX1*(NM_000209.4):c.664G>A (p.Glu222Lys), uma variante do tipo missense em heterozigose situada no exon 2. Possui boa cobertura e balanço alélico AF 44%/AO 19/DP 43. Sua frequência em bancos de dados populacionais é 0,1642% no ABraOM e de 0,0018% no gnomAD, além de pontuar 0,38 no preditor *in silico* REVEL.

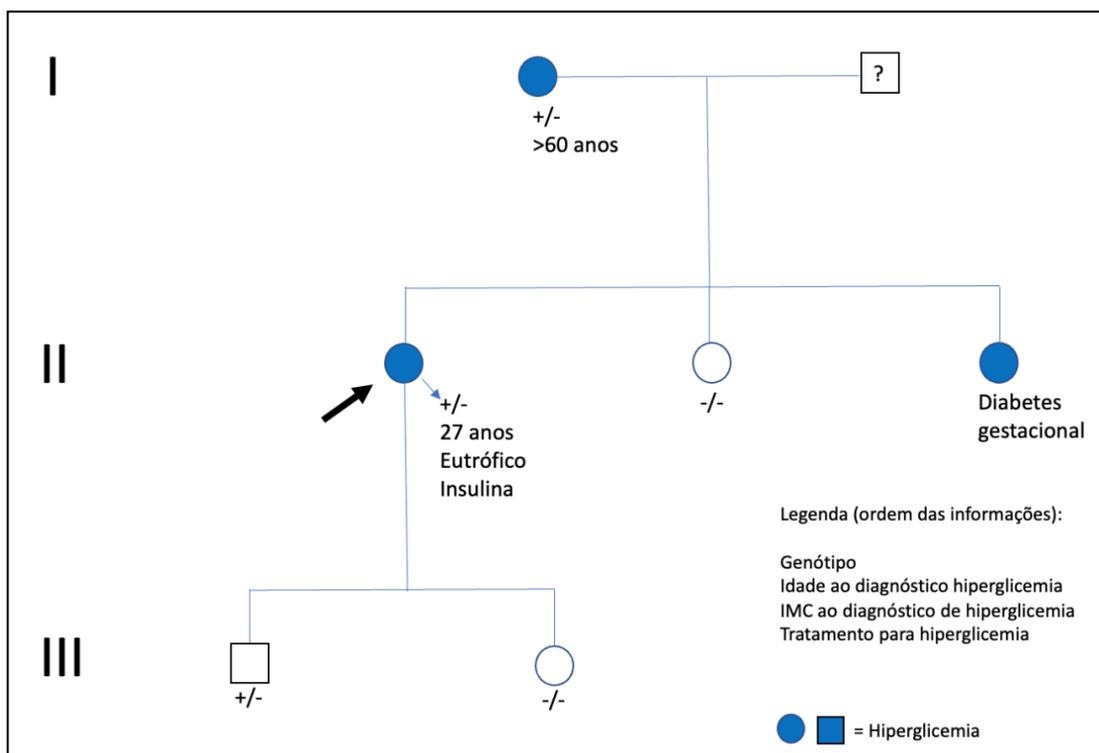
Probando 11, sexo masculino, nascimento em São Paulo – SP, 35 anos de idade, foi diagnosticado com DM aos 27 anos, eutrófico, durante doença infecciosa intercorrente. Anti-GAD não reagente. Inicialmente, tratado com insulinoterapia (0,68 UI/kg/dia) e metformina. Tratamento este que se mantém dessa forma até hoje com 35 anos de idade, quando apresenta IMC de 24,7, dislipidemia, rins em ferradura, hipoacusia, pâncreas de morfologia normal pela tomografia de abdome, com seguinte perfil glicêmico: glicemia de jejum 193 mg/dL; peptídeo C 1,1 ng/dl; HbA1c 9,3%. Esta história de DM pontua 6,4% pelo *MODY calculator* e, portanto, este probando foi classificado como **pouco típico para MODY**.

Do ponto de vista familiar (Figura 35), mãe diagnosticada com DM após os 60 anos de idade, portadora da variante, possui duas irmãs, sendo uma sem DM, não portadora da variante e outra (sem material genético coletado) diagnosticada com DM

durante gestação e se mantém em tratamento com ADOs. Possui dois filhos, um do sexo masculino que possui a variante, nascimento com macrossomia (4,1 kg e 51 cm de comprimento), sem DM e outra, sexo feminino sem DM. Os dados de idades atuais e ao diagnóstico de DM são escassos em prontuário deste probando.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **benigna** (BA1 *stand alone*).

Figura 35 - Heredograma da família com a variante nuclear **missense c.664G>A** no ***PDX1***



IMC: índice de massa corporal; **Seta negroito:** Probando 11; **-/-** não carrega variante; **-/+** portador heterozigoto da variante

Variante missense c.1513C>A no *HNFI1A* – Probando 12

A quarta variante foi *HNFI1A* (NM_000545.8):c.1513C>A (p.His505Asn), uma variante do tipo missense em heterozigose situada no exon 8. Possui boa cobertura e balanço alélico AF 43%/AO 13/DP 30. Sua frequência em bancos de dados populacionais é ausente no ABraOM e de 0,008% no gnomAD, além de pontuar 0,76 no predito *in silico* REVEL.

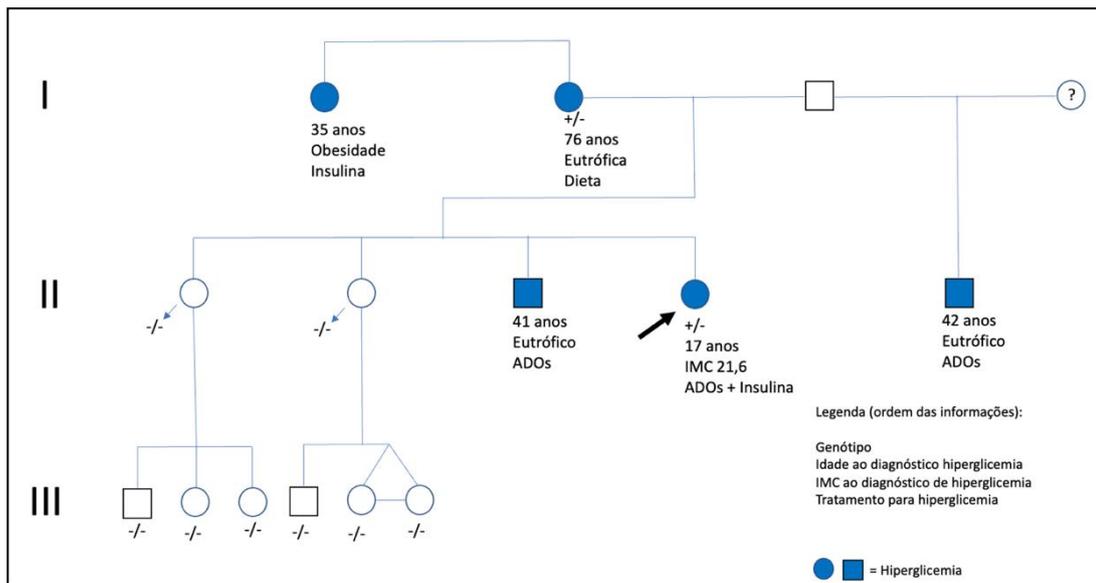
Probando 12, sexo feminino, nascimento em Balsas-MA, foi diagnosticada com pré-DM aos 17 anos de idade, com IMC de 21,6, em exames de rotina. Permaneceu sem tratamento farmacológico e sem acompanhamento médico regular até os 32 anos, quando se mudou para São Paulo e foi diagnosticada com DM com IMC de 23,4. Aos 38 anos apresentou anticorpos anti-célula beta não reagentes (Anti-GAD, Anti-insulina e Anti-IA2). Fez uso de metformina dos 32 anos até os 40 anos, quando foi associado gliclazida ao tratamento. Hoje, aos 48 anos, com IMC de 26,6, possui nefropatia diabética, hipertensão arterial sistêmica, em uso de metformina, gliclazida e 4 UI de insulina rápida ao dia. Apresenta perfil glicêmico com: glicemia de jejum de 124 mg/dL; HbA1c de 7,1%; peptídeo C 1,89 ng/mL. Este probando foi considerado como fenótipo **típico para MODY** (considerando o diagnóstico de hiperglicemia aos 17 anos e *MODY calculator* de 75,5%).

Do ponto de vista familiar (Figura 36), pai com 87 anos sem DM, mãe com 77 anos, diagnosticado DM aos 76 anos e não faz tratamento farmacológico para tal. Tia materna com DM diagnosticado aos 35 anos de idade, em vigência de obesidade, em uso de insulina desde então. Possui 7 irmãos, sendo que dois são somente por parte paterna. Um irmão por parte paterna, tem 54 anos, diagnosticou DM aos 42 anos, eutrófico e em tratamento com ADOs. Sem dados sobre o segundo irmão por parte paterna. São 5 irmãos por parte materna e paterna, porém somente dados clínicos de 3 deles. Um irmão de parte paterna e materna, 42 anos de idade, diagnosticou DM aos 41 anos de idade, eutrófico, em tratamento com ADOs. Uma irmã, 44 anos, não tem DM, nem possui a variante, e possui 3 filhos (22 anos, e dois irmãos gêmeos monozigóticos de 17 anos) sem a variante e sem DM. Outra irmã de 47 anos, não

possui a variante, diagnosticou DM aos 45 anos, eutrófica, em tratamento com medidas dietéticas e possui 3 filhos (20 anos, 15 anos e 11 anos) sem DM e sem a variante.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **provavelmente benigna** (*BS1strong + PP3supporting*).

Figura 36 - Heredograma da família com a variante nuclear **missense c.1513 G>A** no *HNF1A*



IMC: índice de massa corporal; **ADOs:** antidiabéticos orais; **Seta negro:** Probando 12;

Variante missense c.92G>A no *HNF1A* – Probando 13

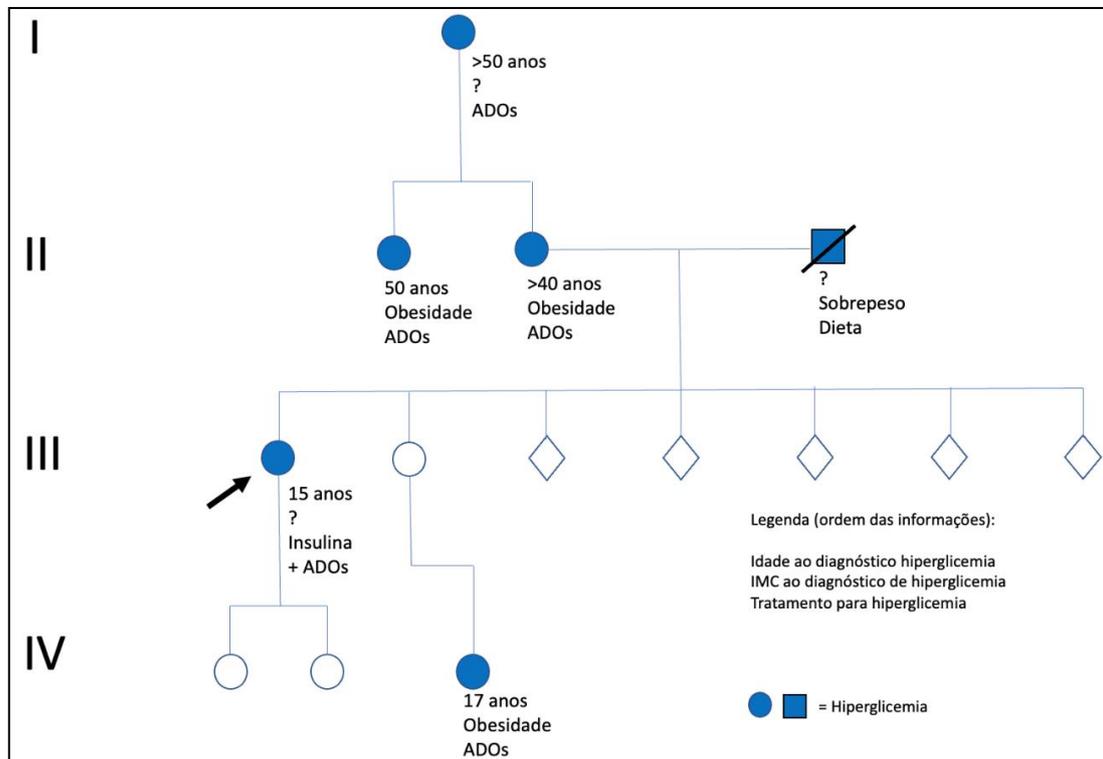
A quinta variante foi a *HNF1A* (NM_000545.8):c.92G>A (p.Gly31Asp), uma variante do tipo missense em heterozigose situada no exon 1. Possui boa cobertura e balanço alélico AF 48%/AO 68/DP 142. Sua frequência em bancos de dados populacionais é 0,082% no ABraOM é de 0,0075% no gnomAD, além de pontuar 0,59 no predito *insilico* REVEL.

O probando 13, com 41 anos de idade, sexo feminino, nascimento em São Paulo – SP, teve diagnóstico de DM aos 15 anos, em vigência de poliúria, polidipsia e perda de peso. Em tratamento com insulino terapia associado a ADOs (gliclazida e metformina) desde o momento do diagnóstico. Apresentou anticorpos anti-células beta (Anti-GAD e Anti-IA2) não reagentes 12 anos após diagnóstico de DM, associado à manutenção de secreção insulínica evidenciada por peptídeo C, variando entre 1,4 e 2,5 ng/mL sem disfunção renal. Atualmente, com IMC de 26,6 e circunferência abdominal aumentada de 100 cm, em tratamento com 0,77 UI/kg/dia de insulina em esquema basal *bolus* associado a metformina e glibenclamida. Apresentando dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica associados, além de retinopatia não proliferativa leve e microalbuminúria de 60,47mg/g de creatinina. Este probando foi classificado como fenótipo **pouco típico para MODY** (MODY *calculator* de 2,6%)

Do ponto de vista familiar (Figura 37), avó materna falecida com diagnóstico de DM após os 50 anos em tratamento com ADOs. Pai falecido aos 53 anos por neoplasia de tireoide, com histórico de DM em vigência de sobrepeso, sem tratamento farmacológico. Mãe, hoje com 64 anos, diagnóstico de DM após os 40 anos em vigência de obesidade, em tratamento desde então com metformina. Tia materna com diagnóstico de DM aos 50 anos, em vigência de obesidade em tratamento com ADOs. Possui 6 irmãos sem DM e uma sobrinha com DM, diagnosticada aos 17 anos em vigência de obesidade; inicialmente, tratou com insulina e agora somente com metformina. Possui duas filhas, uma de 11 anos e outra de 1 ano de idade sem DM.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **benigna** (BA1*stand alone*).

Figura 37 - Heredograma da família com a **variante nuclear missense c.92G>A no *HNFI1A***



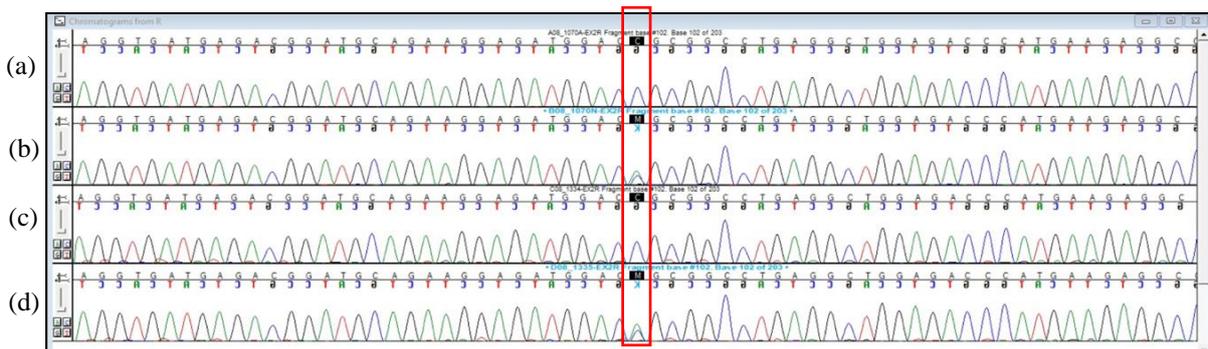
IMC: índice de massa corporal; **ADOs:** antidiabéticos orais; **Seta negrito:** Probando 13;

4.2.5 Variantes detectadas de maneira extrínseca a nossa reanálise

Variante missense c.127C>A no *GCK* – Probando 14

A primeira variante foi a *GCK* (NM_000162.5):c.127C>A (p.Arg43Ser), uma variante do tipo missense em heterozigose situada no exon 2. Sua frequência em bancos de dados populacionais é ausente no ABraOM e no gnomAD, além de pontuar 0,84 no predito *in silico* REVEL. Esta variante foi encontrada por outro projeto de grupo¹⁷¹ em que foi sequenciado o exoma em trio (caso índice, mãe e filho). Neste estudo foi evidenciado a atual variante no *GCK* presente na mãe e ausente no pai e no caso índice (probando 14). Dessa forma, foi recoletada nova amostra (sangue periférico) e novo sequenciamento por Sanger foi realizado, englobando as 4 amostras (amostra antiga do probando 14 (Figura 38a), amostra nova do probando 14 (Figura 38b), amostra do pai (Figura 38c) e da mãe (Figura 38d). Foi então identificada, a variante novamente na mãe e na amostra nova do probando 14 (Figura 38). Foi feita hipótese de troca de amostra acidental do caso índice ou falha em sua identificação.

Figura 38 – Visualização do eletroferograma do sequenciamento por Sanger da variante nuclear c.127C>A no *GCK*



(a) Amostra 1070A: amostra antiga do probando 14; (b) Amostra 1070N: amostra nova proveniente de recoleta do probando 14; (c) Amostra 1334: amostra do pai; (d) Amostra 1335: amostra da mãe.

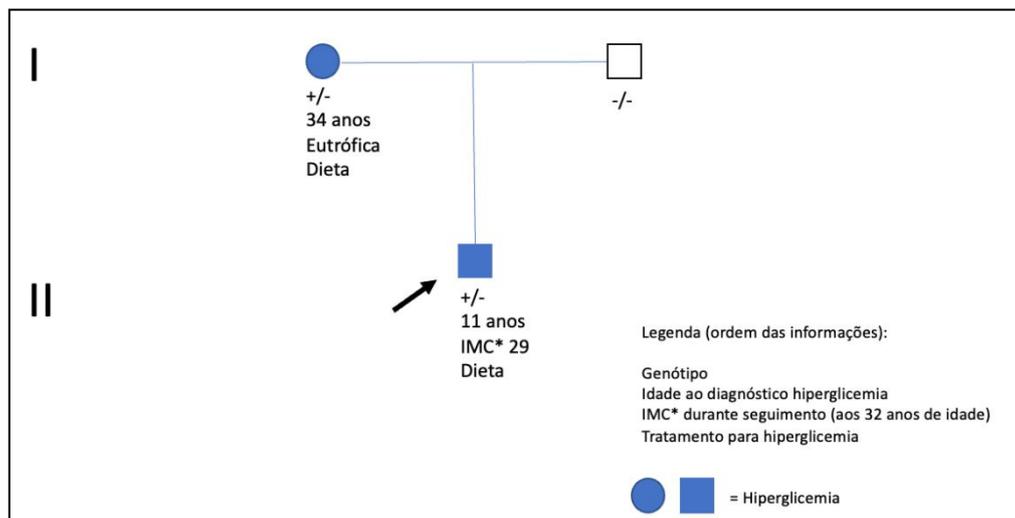
Retângulo vermelho: posição da variante Eletroferograma do sequenciamento por Sanger da variante nuclear c.127C>A no *GCK*

O Probando 14, com 32 anos de idade, sexo masculino, nascimento em Água da Prata, São Paulo, teve diagnóstico de hiperglicemia leve aos 11 anos de idade em exames de rotina, assintomático na época. Fez uso de insulinoaterapia por 3 meses, que foi trocada por metformina até os 24 anos, quando foi suspensa. Paciente manteve hiperglicemia de jejum leve e estável durante todo esse período compatível com MODY-GCK. Teve anticorpos (Anti-GAD, Anti-IA2 e Anti-Insulina) dosados não reagentes 20 anos após o diagnóstico de hiperglicemia. Atualmente, aos 32 anos, mantém sem tratamento farmacológico para hiperglicemia, com bom controle glicêmico (glicemia de jejum: 121 mg/dL; HbA1c: 6,1%; peptídeo C:3,65 ng/mL) com IMC de 29, dislipidemia mista (LDL 145 mg/dL e triglicerídeos de 489 mg/dL) e sem complicações micro ou macrovasculares detectadas. Este probando foi classificado como fenótipo **típico para MODY** (MODY calculator de 75,5%).

Do ponto de vista familiar (Figura 39), mãe, 53 anos de idade, com glicemia de jejum alterada compatível com pré-DM (glicemia de jejum: 110 mg/dL) desde 34 anos, eutrófica, mantendo sem tratamento farmacológico para hiperglicemia até hoje. Pai com 59 anos de idade sem hiperglicemia.

Após devida correlação genótipo/fenótipo esta variante foi classificada como **provavelmente patogênica** (PP4*supporting* + PM1*strong* + PM2*supporting*, PP2*supporting* + PP3*supporting*).

Figura 39 - Heredograma da família com a variante nuclear **c.127C>A no GCK**



IMC: índice de massa corporal; **Seta negrito:** Probando 14; -/- não carrega variante; +/- portador heterozigoto da variante

Variante missense c.2119C>T no *MFN2*– Probando 15

A segunda variante foi a *MFN2* (NM_014874.4): c.2119C>T (p.Arg707Trp), uma variante do tipo missense em homozigose situada no exon 18. Sua frequência em bancos de dados populacionais é ausente no ABraOM e de 0,0251% no gnomAD, além de pontuar 0,84 no predito *insilico* REVEL. Esta variante foi encontrada em outro sequenciamento por painel de genes relacionados a LPD, no qual incluía este novo gene *MFN2*, não contemplado pelo nosso painel de genes.

O probando 15, sexo feminino, 58 anos de idade, nascimento no Rio de Janeiro, capital. Aos 38 anos de idade, foi diagnosticada com perda de gordura em MMII com acúmulo em região centrípeta (face, pescoço e abdome) e pseudo-hipertrofia muscular. Neste período, em vigência de sobrepeso, foi evidenciado, dislipidemia à custa de hipertrigliceridemia (valor máximo de 300 mg/dL), esteatose hepática leve, DM em tratamento com insulina NPH (1,2 UI/kg/dia) associado à metformina e iDPP4, hipertensão arterial sistêmica, lipomatose e polineuropatia diabética periférica. Em estudo de composição corporal por DXA apresentou: 26,6% de gordura total, 16,2% de gordura em MMII e FMR de 1,68. Dessa forma, foi classificada como **fenotípico típico para LPD parcial familiar**. Sem histórico familiar com padrão de perda de gordura e/ou doenças metabólicas semelhantes.

Após devida correlação genótipo/fenótipo, esta variante foi classificada como **provavelmente patogênica** (PS3*strong* + PM5*moderate* + PM2*supporting*, PP3*supporting*).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

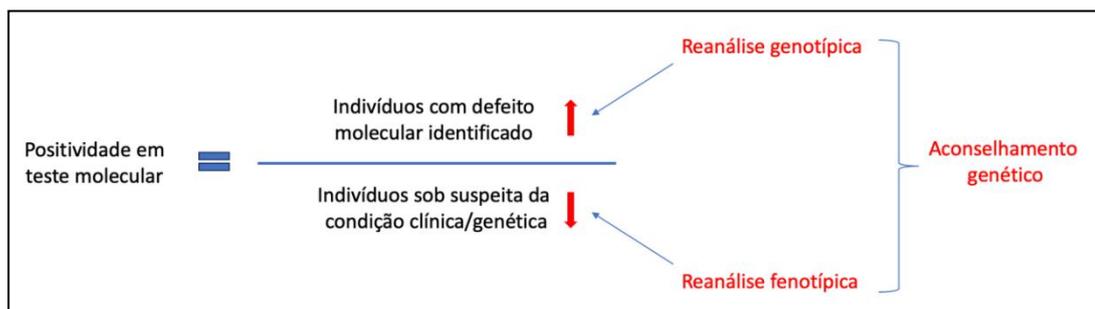
Este estudo teve como objetivo aprimorar o diagnóstico molecular de pacientes com suspeita de DM monogênico, cuja causa não havia sido identificada previamente por meio de diversas estratégias de investigação molecular (como Sanger, tNGS e MLPA). Para alcançar esse objetivo, reexaminamos os dados moleculares obtidos por meio de um amplo sequenciamento de nova geração (tNGS), que incluiu 51 genes nucleares e o genoma mitocondrial completo. Além disso, realizamos uma análise fenotípica adicional para compreender melhor por que alguns indivíduos com suspeita de DM monogênico permanecem sem uma causa molecular esclarecida. Com a combinação destes dois procedimentos, o número de indivíduos com resposta mais precisa sobre sua condição clínica, seja por um novo achado molecular ou reinterpretação de seu fenótipo, aumentou de forma relevante.

5.1 IMPACTO DA REANÁLISE EM POSITIVIDADE DOS PACIENTES COM DM MONOGÊNICO

A positividade de diagnóstico genético é uma relação dada pelo numerador composto por indivíduos com defeito molecular causador identificado e o denominador composto por indivíduos sob suspeita da condição clínica/genética (Figura 40). A ampla reanálise realizada pelo atual trabalho atuou nestes dois números: 1- a reanálise genotípica permitiu a identificação de novos achados moleculares causadores antes não identificados, aumentando o numerador; 2- a reanálise fenotípica identificou indivíduos com fenótipos pouco típicos para DM monogênico, mais provavelmente se tratando de sobreposições fenotípicas com etiologias poligênicas muito prevalentes em nosso meio (DM tipo 1 ou DM tipo 2), e permitiu diminuir o denominador. Em outras palavras, a reanálise fenotípica, especialmente em casos de hiperglicemia, mostrou-se eficaz em solucionar um dos motivos pelos quais a literatura

aponta como causa para testes de sequenciamento genético “negativos”: o fato da coorte estudada não possuir, em última análise, um fenótipo de origem Mendeliana ¹⁷².

Figura 40 - Esquematização dos mecanismos pelos quais a reanálise fenotípica e genotípica combinada impacta na positividade em teste molecular



Segundo definição do *National Human Genoma Research Institute* (<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Counseling>), o objetivo do aconselhamento genético é fornecer informações sobre como uma condição genética pode afetar um indivíduo e/ou seus familiares, assim como interpretar resultados genéticos projetados para estimar o risco de uma doença nestes ou naquele. Este processo integra a interpretação dos históricos familiar e médico para avaliar a chance de ocorrência e recorrência de doenças. Assim, permite-se um melhor entendimento da história natural e do prognóstico da condição de saúde estudada, escolhas terapêuticas personalizadas, testagem em cascata com diagnóstico e aconselhamento de seus familiares, além de encerrar o peso da incerteza diagnóstica, evitando intervenções médicas desnecessárias. Dessa forma, tanto um achado molecular positivo em um fenótipo classificado como típico, assim como a ausência de novas variantes identificadas em fenótipos pouco típicos podem ser considerados de alto impacto para o paciente e seus familiares. Neste ponto que nosso trabalho é inovador pois, até então, a ênfase empregada na maioria dos estudos em reanálise ^{106,112,114,115,117,118,119-123,172} é em relatar o aumento da acurácia diagnóstica e consequente aconselhamento genético através de novos achados moleculares. Nestes trabalhos, através de novos achados clínicos, a reanálise fenotípica teve um papel de

expandir as possibilidades de novos genes a serem investigados e não de reclassificar o fenótipo como não sendo causado por defeitos moleculares de alta herdabilidade (monogênico). Talvez isso ocorra, pois estes trabalhos foram realizados em coortes cujos fenótipos eram raros, muitas vezes sindrômicos e que sofrem pouca influência de fatores ambientais, como pacientes pediátricos com distúrbios do desenvolvimento neuropsicomotor, o que torna a etiologia monogênica praticamente obrigatória. Em oposição, o fenótipo de hiperglicemia não só possui alta incidência populacional (a IDF <https://diabetesatlas.org/> estima em torno de 10% da população brasileira em 2021), como também sofre influência de um ambiente marcadamente obesogênico^{173,174}, mesmo na infância¹⁷⁵, em nossa contemporaneidade. Este fato torna mais provável a sobreposição entre os diversos fenótipos de hiperglicemia, tornando a suspeição de DM monogênico, em especial o MODY e LDP parcial familiar, um desafio maior. Especificamente em relação a DM monogênico, um único estudo de reanálise em MODY¹²⁵ também não abordou a reanálise fenotípica.

Como os pacientes com DM monogênico apresentam fenótipos diversos de hiperglicemia, a magnitude do impacto da reanálise será discutida em números a seguir separadamente para cada subtipo: MODY-GCK; MODY - não GCK; LPD parcial familiar; DMN; Síndrome de Wolfram e DM Mitocondrial. Os mecanismos pelos quais os novos achados moleculares foram identificados durante a reanálise serão categorizados segundo o proposto em revisão recente sobre o tema, sendo a principal descoberta de novas associações gene-doença / variante-doença¹¹⁶.

5.1.1 Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com MODY-GCK

A coorte de indivíduos com suspeita de MODY-GCK, teve um aumento de 16,67% (de 16,66% para 33,33% - Figura 6) em sua positividade molecular, quando se analisa o impacto da positividade somente na última etapa de investigação molecular pelo tNGS (Figura 1). Este aumento foi tanto em decorrência de novos achados moleculares quanto da reclassificação fenotípica. Ao analisarmos a coorte de suspeitos para MODY-GCK desde o início do processo de investigação molecular (englobando a primeira etapa por Sanger, a segunda etapa por tNGS e a terceira etapa pela reanálise), tem-se uma **positividade total final para este fenótipo de 85,56%**.

Do ponto de vista molecular, por se tratar de um fenótipo de baixa variabilidade e causado por mutações, até então, em um único gene, o *GCK*, era esperado que a reanálise genotípica dessa coorte fosse uma oportunidade de identificar novas possibilidades de defeitos moleculares neste gene. Entretanto, o novo achado molecular de uma variante missense no *GCK* identificada no probando 14 apenas perpetua o conhecimento vigente de que variantes missenses são as principais causadoras deste fenótipo¹³⁶. Por outro lado, o mecanismo pelo qual essa variante foi identificada pela reanálise após um novo sequenciamento por exoma em trio (mãe, pai e probando) chama a atenção para a possibilidade de um indivíduo não ter um diagnóstico molecular positivo por falha humana durante o processo de preparo das bibliotecas de DNA. Causas essas não abordadas como possibilidade pela literatura em reanálise até então^{116,172}, o que traz a luz da possibilidade de coleta de amostra para ressequenciamento como uma nova possível solução. Como ocorreu uma nova metodologia de sequenciamento, o exoma, podemos categorizar este achado como proveniente da “expansão de teste genético”¹¹⁶, entretanto, este mesmo achado poderia ter sido feito com apenas a coleta do DNA do probando e novo sequenciamento pela mesma metodologia de tNGS.

Do ponto de vista fenotípico, a separação em fenotípicos típicos e pouco típicos pela utilização de dois critérios clínicos (pontuação na ferramenta *MODY calculator* e idade ao diagnóstico de DM) trouxe à luz uma heterogeneidade importante dentro deste grupo identificado como suspeito para MODY-GCK (Tabela 4). Primeiramente, é notória a diferença de idade do diagnóstico de DM, sendo que o grupo típico apresentou uma mediana de idade estatisticamente diferente ($p=0,006$) de 12,5 anos contra 33 anos e cujos intervalos interquartis de ambos os grupos não se cruzavam. Este fato demonstra como uma análise clínica mais detalhada dentro de um grupo de indivíduos classificados como tendo a mesma suspeita clínica pode evidenciar diferenças robustas intragrupo. Neste caso específico, os indivíduos classificados como pouco típicos, com idade ao diagnóstico de hiperglicemia entre 30 e 35 anos, torna a hipótese de origem monogênica mais baixa. Por se tratar de um fenótipo altamente complexo, a hiperglicemia pode ser causada por múltiplos mecanismos envolvendo diversos órgãos: pâncreas, fígado, músculo, cérebro e tecido gorduroso¹⁷⁶. Dessa forma, uma forma interessante de explicar a hiperglicemia neste grupo, seria

uma análise mais detalhada de sua composição corporal que vai além do IMC, como medidas antropométricas ou mesmo densitometria de corpo inteiro que tem forte associação com o desenvolvimento de hiperglicemia ¹⁷⁷, assim como o cálculo do escore de risco poligênico para DM tipo 2 ¹⁷⁸. Uma outra hipótese seria pensar que estes indivíduos pouco típicos representam uma variação da normalidade em seus níveis de glicemia de jejum e HbA1c. Uma vez que possuem níveis de hiperglicemia muito próximos do intervalo de normalidade (mediana da HbA1c de 5,7% e mediana da glicemia de 105 mg/dL), variações em decorrência do método laboratorial podem ter sido suficientes para gerarem a suspeita de MODY-GCK. Sabe-se que a glicemia de jejum pode sofrer uma variação intraindivíduo de 5,7 a 8,3% assim como interindivíduo de até 12,5% ¹⁷⁹. Em relação a HbA1c, estudos mostram que indivíduos de diferentes ancestralidades podem ter uma capacidade de glicação diferente, o que pode gerar uma diferença interindividual de até 0,4% em seus valores ¹⁷⁹. Sendo assim, essas pequenas variações laboratoriais já são suficientes para trazerem estes indivíduos para níveis normais de glicemia de jejum <100 mg/dL e HbA1c < 5,7% ¹⁸⁰, tornando este grupo uma possível variação da normalidade.

Por outro lado, o grupo de indivíduos caracterizados como fenótipo típico com mediana de idade do diagnóstico de hiperglicemia de 12,5 anos se assemelha a nossa coorte de indivíduos com defeito molecular comprovando no *GCK* ¹³⁶. Assim sendo, neste grupo, seria interessante um estudo molecular ainda mais profundo de possíveis variantes no *GCK*. O estudo do transcrito por sequenciamento de RNA como forma de identificar variantes intrônicas profundas ¹⁸¹, assim como a utilização de outras metodologias como o *CGH-array* ¹⁸² para identificação de CNVs podem ser caminhos futuros para explicar o fenótipo deste grupo típico para MODY-GCK.

Um ponto que merece destaque na discussão são os 8 indivíduos que, apesar de terem sido reanalisados do ponto de vista genotípico sem nenhum novo achado molecular, não foram classificados em fenótipos típicos ou pouco típicos por falta de dados clínicos ou pela resolução da hiperglicemia. Estes representam um grupo expressivo de indivíduos (22,22%) do total da coorte de MODY-GCK até então atribuídos como “negativos” para investigação molecular. Ao todo 4 (11,11%) indivíduos, após maior seguimento clínico e reanálise, foram identificados como hiperglicemia transitória da infância, sendo um deles em decorrência, provável, do uso

de GH para déficit de crescimento. A literatura ^{183,184} aponta como possibilidade comum, em torno de 5 a 10% de prevalência deste evento em crianças durante período de estresse contrarregulatório (infecção, uso de medicamentos como corticosteroides, internação hospitalar entre outros), o que justificaria o caso de nosso paciente em uso de GH. Entretanto, os demais 3 casos de hiperglicemia resolvida na infância e as formas pelas quais foram tratados os casos leves, compatíveis com MODY-GCK, muito provavelmente podem também ter sido variação laboratorial como discutido anteriormente. De toda forma, como a literatura é escassa em relação ao prognóstico deste fenótipo a longo prazo, ainda assim, esses indivíduos devem manter seguimento clínico endócrino. Apesar de dificilmente se tratar de MODY-GCK, afinal muitos apresentaram glicemias de jejum abaixo de 90 mg/dL durante seguimento muito incompatíveis com este fenótipo, fica a interrogação sobre a possibilidade de possuírem maior predisposição a desenvolver hiperglicemia na idade adulta. Dentre os demais 3 indivíduos adultos com resolução da hiperglicemia, a primeira delas foi diagnosticada aos 28 anos com IMC de 19 próximo de magreza, composição corporal avaliada por DXA, identificando baixa massa gorda e baixa massa magra, além de sinais de resistência insulínica como SOP. Sua hiperglicemia e SOP foram resolvidas durante seguimento após ganho de peso. Este caso ilustra um fato interessante de resistência insulínica induzida por magreza apontado na literatura ¹⁸⁵, que será discutido em mais detalhes a seguir (seção 5.2.2) com o probando 1 que apresentou quadro semelhante. Os demais 2 indivíduos possuíam dados clínicos escassos ao diagnóstico de hiperglicemia, com relatos em prontuário apenas de hiperglicemia diagnosticada por volta dos 25 anos de idade, sem documentação laboratorial, mas que, durante reanálise após 5 anos de seguimento, foram evidenciados perfis glicêmicos normais e, portanto, descartada a possibilidade de MODY-GCK. O último, ocorreu uma escassez de dados clínicos mais intensa pois: 1- o recontato com o paciente/médico responsável não foi efetivo; 2- mesmo a vasta busca em prontuário eletrônico e/ou banco de dados internos do nosso grupo de pesquisa não foi capaz de acrescentar informações clínicas. Estes últimos 3 pacientes ilustram duas problemáticas importantes já discutidas na literatura científica de reanálise. Por se tratar de um procedimento investigativo que demanda armazenamento de dados por um período longo, os dados precisam de um sistema de armazenamento robusto ¹¹⁶

que, muitas vezes, gera um custo adicional ao laboratório que alguns autores até acreditam ser mais elevado do que coletar nova amostra de DNA do paciente e realizar um novo sequenciamento com tecnologias futuras mais baratas¹²⁰. A outra questão é a dificuldade de recontato com o paciente após um longo período de tempo, pois simplesmente, os dados para contato, tanto do paciente quanto do médico responsável, podem não mais estarem atualizados¹⁸⁶.

5.1.2 Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com MODY-não GCK

A coorte de indivíduos com suspeita de MODY-não GCK, teve um aumento de 9,93% (de 13,35% para 23,28% - Figura 7) em sua positividade molecular, quando se analisa o impacto da positividade somente na última etapa de investigação molecular pelo tNGS (Figura 1). Este aumento foi tanto em decorrência de novos achados moleculares quanto da reclassificação fenotípica. Ao analisarmos a coorte de suspeitos para MODY-não GCK desde o início do processo de investigação molecular (englobando a primeira etapa por Sanger/MLPA, a segunda etapa por tNGS e a terceira etapa pela reanálise) tem-se uma **positividade total final para este fenótipo de 38,29%**.

Do ponto de vista molecular, a reanálise fenotípica acrescentou um novo achado de variante em região regulatória, situado do promotor do gene *HNF1A* no probando 3. Uma revisão recente que avaliou a história da descoberta de genes relacionados a DM monogênico publicada em 2020 por Elisa de Franco¹⁸⁷, mostrou que de 36 genes relacionados a este fenótipo, apenas um (região *enhancer* do *PTF1A*), até então, havia sido descoberto por técnicas de sequenciamento que iam além de regiões codificantes, no caso do genoma completo. Este fato explica o motivo de defeitos moleculares em regiões regulatórias serem causa rara, ou praticamente ausente, no fenótipo de MODY^{42,45} como será mais bem abordado na sessão específica para discussão do probando 3 a seguir (seção 5.2.1). A abordagem agnóstica do nosso grupo de pesquisa de sequenciar, adicionalmente, 1000 pares de base a montante do sítio de início de transcrição dos genes relacionados a MODY, acreditando que muito provavelmente ali se situaria o promotor do respectivo gene, foi capaz de identificar esta variante. Entretanto, através de projetos de mapeamento de regiões funcionais

como ENCODE¹⁸⁸, muitas das regiões regulatórias dos genes de MODY podem estar fora desta pequena sequência *upstream* de 1000 pares de base. Isso nos leva a crer que muitas das causas moleculares ainda não estabelecidas podem ser variantes situadas em regiões regulatórias em outros locais que não os 1000 pares de base *upstream*. Dessa forma, a rotineirização da investigação molecular por métodos de sequenciamento mais amplo que englobem o genoma humano completo podem ser a solução para estes casos. Há aqui um exemplo de identificação de nova causa molecular por nova associação variante-doença¹¹⁶.

Do ponto de vista fenotípico, assim como na coorte de indivíduos clinicamente suspeitos para MODY-GCK, a reanálise teve um impacto relevante, pois foi capaz de identificar perfis de probandos com hiperglicemia provavelmente diferentes dentro do mesmo grupo original de indivíduos (Tabela 5). Um aspecto relevante foi o fato de os probandos classificados como pouco típico apresentarem um perfil de insulinopenia mais intenso. Esta interpretação foi em decorrência de uma diferença estatisticamente relevante na proporção destes indivíduos que apresentaram sintomas de polis ao diagnóstico de hiperglicemia (77,3% no grupo pouco típico contra 30% no grupo pouco típico, valor $p = 0,047$), assim como uma necessidade de insulinoterapia neste momento maior (57,2% no grupo pouco típico contra 9,6% no grupo típico, valor $p=0,001$). Este fato explica também a discrepância de pontuações pela calculadora de MODY (4,6% no grupo pouco típico contra 75% no grupo típico, valor $p = 1,64E-10$), cuja pontuação sofre influência negativa quanto maior for a necessidade de insulinização precoce do probando. Outra diferença estatisticamente relevante foi a ocorrência destes indivíduos pouco típicos possuírem uma história familiar com comorbidades metabólicas mais prevalentes (75,5% no grupo pouco típico, contra 58,8% no grupo típico, valor $p = 0,0355$). Em resumo, o grupo pouco típico se trata de indivíduos com diagnóstico de hiperglicemia jovem, em torno de 23 anos de idade, com necessidade de insulinoterapia precoce e forte histórico familiar para comorbidades metabólicas. Este quadro nos leva a crer que estamos diante, muito provavelmente, de probandos com DM tipo 2 de início jovem, o qual a falência pancreática ocorre de forma mais precoce¹⁸⁹, incompatível com MODY^{136,190}, e a herança poligênica pode ser sugerida pelo histórico familiar rico em casos de DM com comorbidades metabólicas associadas. Nestes indivíduos, esta hipótese pode ser

melhor embasada através do estudo destes indivíduos pelo escore de risco poligênico para DM tipo 2 ¹⁷⁸.

Por outro lado, o grupo de indivíduos caracterizados como fenótipo típico com mediana de idade do diagnóstico de hiperglicemia de 18,5 anos, pontuação elevada pela calculadora de MODY e portanto, menor necessidade imediata de insulinização, assemelha-se a nossa coorte de indivíduos com MODY - não GCK ¹³⁶. Assim sendo, neste grupo, seria interessante um estudo molecular ainda mais profundo e amplo de possíveis variantes nos genes causadores de MODY. O estudo do transcrito por sequenciamento de RNA como forma de identificar variantes intrônicas profundas ¹⁸¹, assim como a utilização de outras metodologias como o CGH-array ¹⁸² para identificação de CNVs podem ser caminhos futuros. Além disso, em oposição ao espectro fenotípico mais restrito apresentado pelos indivíduos com MODY-GCK, os indivíduos com MODY – não GCK apresentam uma ampla variedade clínica e, portanto, mais provavelmente se beneficiariam de estudos moleculares mais amplos, como genoma completo, a fim da busca de novos genes causadores.

Em oposição ao relevante número de indivíduos do grupo de suspeita para MODY – GCK que tiveram sua hiperglicemia resolvida, aqui somente um probando teve resolução de sua hiperglicemia durante seguimento clínico. Este também foi um diagnóstico de hiperglicemia jovem aos 7 anos de idade, suspeito para MODY - não GCK devido sintomatologia mais intensa de poliúria e polidipsia, além de glicemias de jejum mais elevadas, com valores atingindo até 300 mg/dL. Entretanto, o paciente possui diagnóstico de doenças autoimunes, (doença de Chron e Vitiligo) em uso de imunomoduladores (Azatioprina e Messalazina) e sua hiperglicemia resolveu durante seguimento de 5 anos após remissão destas doenças de base e suspensão dos imunobiológicos. Este caso é mais um exemplo de hiperglicemia transitória da infância ¹⁸⁹ que deve ser seguido a longo prazo, pois não sabemos se este fato aumentará suas chances de desenvolver hiperglicemia no futuro, mas, de toda forma, esta descrição clínica pouco provavelmente se trata de um indivíduo com MODY.

5.1.3 Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com DMN

A coorte de indivíduos com suspeita de DMN teve um aumento de 24,68% (de 68,42% para 93,10% - Figura 8) em sua positividade molecular, quando se analisa o impacto da positividade somente na última etapa de investigação molecular pelo tNGS (Figura 1). Este aumento foi tanto em decorrência de novos achados moleculares quanto da reclassificação fenotípica. Ao analisarmos a coorte de suspeitos para DMN desde o início do processo de investigação molecular (englobando a primeira etapa por Sanger, a segunda etapa por tNGS e a terceira etapa pela reanálise) tem-se uma **positividade total final para este fenótipo de 93,33%**.

Do ponto de vista molecular, a reanálise genotípica foi capaz de identificar uma nova variante situada em região *enhancer* do gene *PTF1A* no probando 2. Assim como na coorte de MODY-Não GCK, a reanálise foi capaz de identificar um novo defeito molecular em região regulatória. A mesma discussão aplicada anteriormente para a variante em região promotora do *HNF1A* cabe para este caso. Em resumo, a investigação molecular em DM monogênico recai majoritariamente sobre regiões codificantes do genoma humano, por isso a raridade de descrição de casos de DM monogênico devido a defeitos moleculares em regiões regulatórias. Interessante mencionar que até a revisão de 2020 de Elisa de Franco ¹⁸⁷, somente uma nova causa de DM monogênico havia sido descoberta por técnicas de sequenciamento que abrangem além da região codificadora, e essa descoberta foi justamente a identificada aqui neste probando 2: a região *enhancer* do *PFT1A*. O probando 2 teve seu sequenciamento realizado pela segunda versão do tNGS durante a terceira corrida que ocorreu em 2016. Como será mais bem discutido em sessão posterior para o probando 2 (seção 5.2.1), a região *enhancer* do *PTF1A* teve sua primeira descrição associada a DMN em 2014 ⁶⁰, e, portanto, a versão do painel de 2015 já contemplava esta região. Entretanto, somente a partir de 2020, com a publicação de mais casos e seguimento clínico que esta região se consagrou como causadora de DMN e agenesia pancreática ¹⁹¹. Aqui se tem um exemplo de identificação de nova causa molecular por nova associação gene-doença ¹¹⁶.

Do ponto de vista fenotípico, assim como indivíduos com MODY-GCK, o DMN é um quadro clínico cujo espectro é mais restrito e de alta herdabilidade, afinal,

trata-se do desenvolvimento de DM já nos primeiros meses de vida. Dessa forma, apesar de maior heterogeneidade genética (em torno de 37 genes descritos causadores de DMN¹⁵⁰) pela sua alta herdabilidade e pouca influência ambiental, espera-se uma maior positividade em investigação molecular para doenças monogênicas. A evolução da literatura científica na temática de DMN demonstrou que a causa molecular monogênica se devia quase unicamente aos casos de DM diagnosticados nos primeiros 6 meses de vida. Esse conceito nem sempre foi assim¹². Com o passar dos anos, a idade limite para se considerar uma causa monogênica não autoimune de DMN mudou dos primeiros 30-45 dias de vida¹⁹², para 3 meses, depois 6 meses¹⁹³, 9 meses¹⁹⁴ e atualmente retornando para os 6 meses de vida¹⁵⁰. Essa variação ao longo do tempo na definição de qual idade considerar o DMN mostra como a ciência amadurece em relação à definição de fenótipo, que não é algo inerte. O DMN é um exemplo marcante da importância da reanálise fenotípica periodicamente. O achado molecular adicional proveniente da reanálise genotípica ocorreu no probando 2, que foi diagnosticado com DM antes dos 6 meses de idade. Além disso, quando se analisa toda a positividade da coorte suspeita para DMN, nota-se uma diferença grande de positividade molecular, sendo 68,42% quando se analisa indivíduos com DM antes dos 12 meses de idade, contra 93,10% em indivíduos com DM antes dos 6 meses de idade. Dessa forma, o atual trabalho confirma a literatura vigente de que este fenótipo é bem mais provável nos 6 primeiros meses de vida.

Por fim, importante mencionarmos que um indivíduo desta coorte foi excluído por falta de dados clínicos, uma problemática da reanálise^{116,186} já discutida anteriormente na coorte de MODY-GCK. Outro indivíduo foi excluído por falha de sequenciamento devido à qualidade da amostra de DNA ruim. A literatura aponta uma gama variada de possibilidades para uma eventual incerteza na qualidade do sequenciamento de DNA¹⁹⁵ (erros na chamada de variantes, erro na identificação de bases etc.) e que muitas vezes decorrem de problemas técnicos complexos ou mesmo imprevistos. Mais especificamente, os erros originados na preparação da amostra comumente são devidos a uma combinação de erros humanos no manuseio da amostra (que pode incluir trocas de amostras ou degradação de DNA e/ou RNA), contaminação da amostra e baixas quantidades de DNA de entrada. Além disso, durante a preparação de bibliotecas de sequências, erros humanos podem resultar em contaminação cruzada

de amostras de DNA em diferentes preparações de bibliotecas ¹⁹⁶. A literatura aponta uma grande variação na acurácia da chamada de bases em técnicas de sequenciamento por NGS (de um erro a cada mil ¹⁹⁷ até um erro a cada milhão ¹⁹⁸ de nucleotídeos), sem precisar o quanto disso seria em decorrência de falha humana. De toda forma, no atual trabalho, ao todo, 4 indivíduos foram originalmente apresentados como negativos para investigação molecular, mas que na verdade, tratou-se de falha humana que pode ser corrigida com nova coleta de amostra de DNA e novo sequenciamento. Dentre estes, somente um teve seu caso resolvido por nova coleta de DNA e novo sequenciamento, que foi o caso do probando 14 (variante encontrada no gene *GCK*). Os restantes 3 indivíduos, sendo um deles proveniente da atual coorte de DMN e outros 2 do grupo de suspeita para LPD familiar (que serão abordados em sessão a seguir – 11.1.4) ainda aguardam nova oportunidade de coleta de DNA e sequenciamento. Este fato é notório, uma vez que 4 indivíduos de nossa coorte de 128 representam 3,12% dos casos.

5.1.4 Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com LDP parcial familiar

A coorte de indivíduos com suspeita de LPD parcial familiar, teve um aumento de 26,03% (de 27,27% para 53,3% - Figura 9) em sua positividade molecular. Este aumento foi tanto em decorrência de novos achados moleculares quanto da reclassificação fenotípica. Ao analisarmos a coorte de suspeitos para LPD parcial familiar desde o início do processo de investigação molecular (englobando a primeira etapa por Sanger, a segunda etapa por tNGS e a terceira etapa pela reanálise), tem-se uma **positividade total final para este fenótipo mantida igual a 53,3%**, uma vez que não foram adicionados novos diagnósticos moleculares na etapa anterior pela investigação por Sanger.

Do ponto de vista molecular, dois novos achados explicaram o fenótipo. Um deles foi uma variante mitocondrial no gene *MTTK* no probando 7 e outra variante nuclear em homozigose no gene *MFN2* no probando 15, ambos genes cujas disfunções estão relacionadas a doenças do tecido adiposo. Estes dois pacientes foram classificados como fenótipos típicos (<25% de gordura em MMII) pela reanálise

fenotípica (Tabela 6). As peculiaridades de cada gene serão discutidas em sessões específicas (seção 5.2.1 para o *MTTK* e seção 5.2.4 para o *MFN2*) relacionadas aos respectivos probandos posteriormente. Neste momento, cabe a discussão dos mecanismos que levaram a esse aumento de positividade. Em relação ao achado no gene *MFN2*, trata-se de uma causa muito comum na reanálise, a identificação de novos genes relacionados ao fenótipo que ocorre com o desenvolvimento do conhecimento científico nesta área. Neste específico caso, quando ocorreu o contato médico para reanálise, foi visto que a paciente havia sido submetida a um outro estudo molecular, também por painel de genes, porém mais amplo e atualizado, que contemplava o sequenciamento do gene *MFN2*. Em contrapartida, a identificação de uma variante mitocondrial em paciente com fenótipo de LPD parcial familiar, mostra a importância do sequenciamento do genoma mitocondrial em indivíduos com suspeita de DM monogênico. Já é sabido pela literatura que a função mitocondrial adequada é fundamental tanto para a produção de insulina pela célula beta pancreática^{79,199} quanto para o adequado funcionamento de sua sinalização em seus receptores de insulina⁸⁰. Dessa forma, entendendo que o fenótipo de DM monogênico é caracterizado, em última instância, por uma hiperglicemia em decorrência de defeitos moleculares que resultam em insulinopenia ou aumento de resistência insulínica, ou mesmo a combinação dos dois eventos, a investigação rotineira de defeitos moleculares mitocondriais faz sentido neste grupo de pacientes. Especificamente, em relação ao fenótipo de LPD parcial familiar, revisão recente dos mecanismos moleculares neste fenótipo não aponta variantes mitocondriais como causadoras, apesar de levantar a hipótese de que podem ser uma causa possível de “doenças lipodistróficas”²⁰⁰. Tem-se, aqui, um exemplo de identificação de provável nova causa molecular por nova associação gene-doença¹¹⁶.

Do ponto de vista fenotípico, diferente de muitos fenótipos relacionados a DM monogênico, cuja influência ambiental é reduzida, o fenótipo de LPD parcial familiar é mais amplo e com múltiplas comorbidades metabólicas que podem mais facilmente serem influenciadas pelo ambiente ou mesmo confundidas com pacientes com DM tipo 2 que apresentam padrão de distribuição de gordura *lipodystrophic-like*²⁰¹. Esta reflexão se confirma do ponto de vista molecular, onde estudos de GWAS para identificação de variantes de risco poligênico para DM tipo 2, identificaram que

existem 5 *clusters* robustos, sendo um deles caracterizado como *lipodystrophic-like* (baixo IMC, baixo HDL e altos níveis de triglicérides)^{202,203}. Dessa forma, em vigência de uma forte pressão exercida por um ambiente intensamente obesogênico^{173,174} da contemporaneidade, o diagnóstico diferencial entre LPD parcial familiar de origem monogênica e formas mais comuns de DM tipo 2 com fenótipos semelhantes (fenocópias) torna a identificação deste fenótipo um dos mais desafiadores dentro do DM monogênico. Dentre os critérios de seleção de casos suspeitos para LPD parcial familiar usados para o atual estudo, o critério obrigatório de perda de gordura subcutânea em extremidades é certamente o mais importante. O desafio se dá em como identificar esta perda. Por exemplo, a diretriz de 2013²⁰⁴, que foi utilizada como embasamento para a seleção dos casos com suspeita de LPD parcial familiar por projetos anteriores do grupo¹³⁹ aponta a perda de gordura como critério fundamental, mas não define por qual metodologia ela deve ser identificada. A mesma diretriz recomenda que “quando a perda de gordura não for visível por exame físico, hiperglicemia e hipertrigliceridemia que são resistentes ou não responsivas a tratamentos convencionais, podem servir com o único indício ao médico de que o paciente talvez tenha lipodistrofia”. Dessa forma, esforços têm sido feitos para melhor identificar estes indivíduos, e a análise de composição corporal mais precisa, seja por medidas de pregas cutâneas, DXA ou ressonância magnética de corpo inteiro, mostra-se promissora²⁰¹. Quando se pensa nos parâmetros antropométricos obtidos a partir da DXA, Garg e colaboradores em 2020¹³⁸ sugeriram que o percentual de gordura em MMII teve a melhor especificidade (0,995) e sensibilidade (1,0) comparado com outras medidas antropométricas. Este mesmo trabalho determinou um valor < 25%, em indivíduos do sexo feminino, associado a comorbidades metabólicas para a suspeição de LPD parcial familiar. Este trabalho não foi capaz de estabelecer um *cut-off* preciso para indivíduos do sexo masculino devido ao pouco número de pacientes deste sexo diagnosticado com LPD parcial familiar. Dessa forma, o atual trabalho de reanálise, reforçou que este dado é importante para uma melhor fenotipagem destes indivíduos, uma vez que os dois defeitos moleculares novos provenientes da reanálise genotípica foram encontrados nos indivíduos com percentual de gordura em MMII <25%. Interessante notar que mesmo quando avaliamos a positividade molecular, considerando somente indivíduos típicos (Tabela 6), somente 2 dos 4 indivíduos (50%

positividade) do sexo feminino com percentual de gordura < 25% em MMII apresentaram achado no teste molecular compatível. Este dado reforça a literatura nesta temática de que existe forte evidência de genes adicionais para lipodistrofias genéticas, e que portanto, a genotipagem negativa não exclui esta condição genética

201.

Ao todo, 2 indivíduos tiveram falha em seu sequenciamento, fato este relatado pela literatura e discutido neste trabalho em sessão anterior (seção 5.1.3), onde um indivíduo também apresentou a mesma falha. Um deles havia sido classificado como fenótipo pouco típico pela gordura >25% em membros inferiores pela DXA e, portanto, este não impactou na positividade final. Entretanto, o segundo não tinha sido avaliado com DXA e, portanto, não tinha sido classificado nem como fenótipo típico ou não típico. Entretanto, como esse paciente não teve defeito molecular encontrado por falha de sequenciamento, ele também não foi considerado (assim como aqueles classificados como fenótipos pouco típicos) quando se analisou o impacto da positividade da reanálise.

Por fim, um indivíduo com diagnóstico clínico de Síndrome de Barraquer – Simons não teve positividade no teste molecular, mesmo após reanálise genotípica. Este indivíduo foi selecionado previamente para o estudo de lipodistrofias, pois preenchia os critérios de seleção de perda gordura associado a comorbidades metabólicas. Originalmente, a hipótese de uma etiologia molecular monogênica de herança autossômica dominante por defeitos moleculares no gene *LMNB2* foi aventada¹⁶⁹ como causa para estes casos. Entretanto, essa hipótese não se sustentou ao longo do tempo e hoje entende-se que a Síndrome de Barraquer – Simons tenha etiologia molecular complexa, provavelmente poligênica associado a defeitos no sistema imune

200,201,205.

5.1.5 Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com DM mitocondrial

A reanálise não foi capaz de aumentar a positividade molecular na coorte suspeita para DM mitocondrial. Tanto a reanálise genotípica não acrescentou novos defeitos moleculares nessa coorte quanto a reanálise fenotípica não acrescentou novas informações.

Do ponto de vista fenotípico, por se tratar de casos sindrômicos, definidos pela associação de DM a outra comorbidade clínica (em sua maioria hipoacusia e/ou oftalmoplegia), essa coorte já apresentava aspectos fenotípicos suficientes para se suspeitar de defeito mitocondrial. Sendo assim, a reanálise fenotípica, seja pelo seguimento clínico ou pela mais profunda fenotipagem dos indivíduos suspeitos, teria pouca chance de acrescentar novas informações que mudassem a suspeita clínica inicial. Talvez uma questão interessante que a reanálise fenotípica poderia levantar seria a identificação de novos achados fenotípicos que pudessem sugerir defeito molecular em algum dos 300 genes nucleares já descritos associados à doença mitocondrial. Entretanto, essa hipótese teria pouca sustentabilidade, uma vez que somente uma proporção muito pequena dos casos de doença mitocondrial com manifestação endócrina (hiperglicemia por exemplo) é causada por defeitos nesses genes nucleares ⁷⁹.

Do ponto de vista molecular, a literatura aponta que, de todas as possíveis manifestações endócrinas relacionadas a mitocondriopatias (baixa estatura, hipogonadismo, hipoadrenalismo, entre outras), a hiperglicemia é a mais comum delas ⁷⁹. Dentre as variantes mitocondriais conhecidas, a m.3243A>G é apontada como a causa mais comum de hiperglicemia por defeito mitocondrial. Estima-se que a prevalência desta variante seja em torno de 1% de todos os casos de DM, sendo mais comum ainda em indivíduos com DM e insulinopenia mais severa ^{79,206}. Soma-se a isso, trabalhos recentes que mostraram uma alta prevalência de indivíduos (aproximadamente 8%) com suspeita clínica de MODY não GCK, tendo este fenótipo explicado pela variante m.3243A>G ^{47,48}. Em face a todas essas evidências, surpreende que o atual trabalho não tenha identificado indivíduos portadores desta variante mitocondrial, tanto na coorte de indivíduos sindrômicos com suspeita de DM mitocondrial quanto na coorte de indivíduos com MODY não GCK típico. Algumas

reflexões se fazem necessárias para explicar esta ausência de achado. Primeiro, a literatura é vasta em apontar que a busca de variantes mitocondriais no sangue deve ser cautelosa. Uma vez que se trata de um tecido com alta proliferação celular, a heteroplasmia de variantes patogênicas tende a cair a níveis muito baixos no sangue, por seleção ativa. Sua detecção se torna um desafio mesmo para métodos de sequenciamento como o tNGS^{79,206,207}. Este fenômeno parece ser mais intenso em relação, especificamente, à variante m.3243A>G²⁰⁸. Dessa forma, nosso grupo de pesquisa acredita que o nosso método de sequenciamento por tNGS do genoma mitocondrial completo em amostra de sangue periférico, apesar de ter sido eficaz em detectar outra variante mitocondrial (m.8344A>G no probando 7), falhou em encontrar a variante mais comum, a m.3243A>G. Por fim, cabe refletir que os trabalhos anteriores em MODY^{47,48}, apesar de também terem usado o sangue periférico como amostra para extração de DNA, estes pesquisadores não sequenciaram o genoma mitocondrial completo, mas sim a região próxima em busca somente da variante na posição m.3243A>G. Este fato pode ter contribuído para estes grupos terem achados tão relevantes em relação à variante m.3243A>G, uma vez que a pequena região coberta pelo sequenciamento pode ter gerado níveis de cobertura maiores que o nosso trabalho ao sequenciar o genoma mitocondrial completo e, assim, detectar níveis baixos de heteroplasmia característicos dessa variante em sangue periférico. Dessa forma, nosso grupo acredita na importância futura de extrair DNA a partir da urina de nossa coorte com suspeita tanto de DM mitocondrial, quanto de MODY não GCK típico a fim de aumentar acurácia diagnóstica destes grupos. Caso, mesmo assim, mantenha-se uma baixa prevalência da variante m.3243A>G, pode-se levantar a hipótese de que esta não é uma causa comum de hiperglicemia em nossa coorte brasileira por ter uma ancestralidade miscigenada²⁰⁹.

5.1.6 Impacto da reanálise em positividade dos pacientes com Síndrome de Wolfram

A reanálise não foi capaz de aumentar a positividade molecular na coorte suspeita para Síndrome de Wolfram. A reanálise genotípica não acrescentou novos defeitos moleculares nessa pequena coorte composta de um único indivíduo já

identificado previamente como portador de uma variante patogênica em heterozigose no gene *WFS1*, sendo ela: *WFS1*(NM_006005.3):c.1230_1233del (p.Val412SerfsTer29). Como o fenótipo de Síndrome de Wolfram é caracteristicamente de origem autossômica recessiva ²¹⁰, era esperado que o atual projeto fosse capaz de identificar a segunda variante nuclear em trans faltante deste caso, o que não ocorreu. Entretanto, a reanálise fenotípica salientou a presença de autoanticorpos contra célula beta anti-GAD em altos títulos (2000 UI/mL) que podem justificar o motivo da ausência de variantes em homozigose ou heterozigose composta no *WFS1* deste indivíduo.

A Síndrome de Wolfram possui fenótipo marcado pela combinação de eventos clínicos bem definidos e de alta herdabilidade: DM, diabetes insipidus, surdez neurossensorial, atrofia do nervo óptico e neuro degeneração ^{211,212}; dessa forma, a positividade do teste molecular frente a esta suspeita clínica é alta. Tanto em nossa coorte, (Figura 1) de onde 5 pacientes dos 6, com suspeita de síndrome de Wolfram tiveram diagnóstico molecular estabelecido (positividade de 83%), quanto a literatura apontam uma positividade também alta de mais de 90% ²¹⁰. Variantes em heterozigose na *WFS1* já foram relatadas em indivíduos com espectros fenotípicos mais brandos da síndrome ²¹³, sendo este achado comumente chamado de *Wolfram-like-syndrome* (OMIM#614296). Além disso, algumas publicações sugeriram, inclusive, que variantes em heterozigose na *WFS1* poderiam causar o espectro da síndrome completa ²¹⁴ por efeito dominante negativo ou mesmo DM neonatal associado à catarata congênita, surdez neurossensorial e hipotonia ²¹⁵, ambas publicações documentando este efeito dominante negativo em testes funcionais.

A paciente com diagnóstico clínico de Síndrome de Wolfram que participou do projeto da reanálise possui hoje 21 anos de idade e apresenta o espectro fenotípico completo: DM (em insulino-terapia) diagnosticado aos 7 anos de idade, surdez neurossensorial diagnosticado aos 11 anos, diabetes insipidus e atrofia do nervo óptico aos 14 anos. Entretanto, uma análise mais profunda fenotípica deste caso apontou para a positividade ao anticorpo Anti-GAD dosado por ELISA no nível 2000 UI/mL, nível este encontrado em pacientes com DM tipo 1 ²¹⁶. Esta positividade se manteve estável em valores semelhantes ao longo de 4 dosagens feitas entre os 7 anos de idade e 19

anos de idade durante seguimento da paciente. Dessa forma, algumas possibilidades podem ser aventadas para explicar este caso:

- 1- A paciente possui a síndrome de Wolfram clássica e a segunda variante pode ser alguma deleção não encontrada pela reanálise através do CONTRA ou mesmo pela análise visual do IGV. Sendo assim, a positividade do Anti-GAD, isoladamente, seria um achado laboratorial sem ou pouca significância clínica. Estudos apontam uma prevalência em torno de 1% de positividade isoladamente do Anti-GAD em populações, que mesmo após 10 anos de seguimento, não se tornaram diabéticas^{217,218,219}. Esta hipótese torna-se muito pouco provável uma vez que nestas publicações o Anti-GAD foi evidenciado em títulos mais baixos do que do nosso caso.
- 2- A paciente possui uma combinação de dois fenótipos: *Wolfram-like-syndrome* e DM tipo 1. O fenótipo de DM em uso de insulina seria explicado pela autoimunidade e destruição de célula beta característica do DM tipo 1, enquanto os demais comemorativos clínicos (atrofia óptica, diabetes *insipidus* e surdez neurossensorial) seriam explicados como um quadro *Wolfram-like-syndrome* causado pela variante encontrada em heterozigose. Esta possibilidade já foi descrita com esta mesma variante em heterozigose em um probando sem DM, mas com perda auditiva, catarata bilateral e atrofia óptica²²⁰.

A hipótese da variante que a paciente possui, WFS1 (NM_006005.3):c.1230_1233del (p.Val412SerfsTer29), causar um efeito dominante negativo não deve ser considerada, pois as publicações em que esta variante foi citada²²¹⁻²²⁴ como causadora da Síndrome de Wolfram completa identificaram essa variante em homozigose ou heterozigose composta.

5.2 OS NOVOS ACHADOS MOLECULARES PROVENIENTES DA REANÁLISE

Ao analisar regiões antes não priorizadas, a reanálise se mostrou capaz de encontrar novos defeitos moleculares e reclassificar a patogenicidade de achados

moleculares anteriormente classificados como VUS. Nesta seção os novos achados moleculares, assim como os motivos de reclassificação das variantes do tipo VUS serão confrontados com a literatura.

5.2.1 Achados moleculares que explicaram o fenótipo

Foram identificados um total de 3 achados moleculares classificados como patogênicos ou provavelmente patogênicos (Tabela 9), sendo um deles localizado no genoma mitocondrial (em um paciente com fenótipo típico para LPD parcial – Probando 7) e os outros dois em regiões regulatórias (sendo um paciente com DM neonatal típico – Probando 2; e outro com MODY não GCK típico – Probando 3). É importante ressaltar que a reanálise fenotípica se mostrou eficaz, uma vez que esses achados moleculares positivos foram encontrados em 3 pacientes com fenótipos típicos após passarem por várias etapas de filtragem. Dessa forma, destaca-se a relevância tanto das regiões regulatórias quanto do genoma mitocondrial, assim como a necessidade de uma definição fenotípica mais precisa para aprimorar a capacidade de aconselhamento genético em pacientes com DM monogênico.

Probando 2 (DM Neonatal) – Variante em região *enhancer* do *PTF1A*: Chr10:23508363A>G

O *PTF1A* transcreve o *Pancreatic Transcription Factor 1, Alpha Subunit* que é expresso em estágios precoces de progenitores dos ductos pancreáticos, células exócrinas e endócrinas pancreáticas. É, portanto, fundamental para o completo desenvolvimento e função pancreática, tanto exócrina quanto endócrina ²²⁵. Inicialmente, variantes patogênicas neste gene foram associadas a DM Neonatal Síndromico (DM, atrofia cerebelar e atrofia pancreática) ²²⁶. Em 2014, Weedon et al. ⁶⁰, ao estudarem seis indivíduos provenientes de três famílias consanguíneas que possuíam atrofia pancreática isolada, revelaram variantes localizadas em região distal (aproximadamente 25 kb do *PTF1A*). Este mesmo grupo, após realização de testes

funcionais e estudos de segregação, determinou que se tratava de uma região de *enhancer* do *PTF1A*.

A variante do probando 2 (Chr10:23508363A>G), em homozigose, está entre as diversas descritas pelo prévio estudo mencionado ⁶⁰ com fenótipo, portanto, semelhante: DMN com atrofia pancreática não sindrômica. É notório neste probando, o comprometimento do desenvolvimento tanto intraútero quanto pós-natal: baixo peso ao nascimento (1.330 g) e dificuldade de ganho de peso (-2,5DP Z-escore IMC/idade) e desenvolvimento estatural (-3DP Z-escore estatura/ idade) aos 5 meses de idade. Este fato pode ser justificado pelo estado de falta de insulina no ambiente intraútero e a posterior dificuldade de seu desenvolvimento devido à insuficiência exócrina pancreática. São dados compatíveis com o estudo de seguimento recente de Huseyin Demirbilek et al. ¹⁹¹ em que 30 indivíduos com variantes na região *enhancer* do *PTF1A* foram acompanhados por cerca de quatro anos. No trabalho, o peso ao nascimento foi em média -3,42 DP e o comprimento durante o seguimento se manteve em -2DP em 69% dos casos. Também apontou para uma idade média de diagnóstico de DM de cinco dias e história de consanguinidade em 92% das famílias. O fenótipo do probando 2, portanto, é semelhante ao discutido na literatura, o que revela a alta herdabilidade desta condição determinada por uma região regulatória do genoma humano.

Este é um caso que a reanálise permitiu um melhor aconselhamento genético do paciente, informando da necessidade do uso de insulina para o tratamento de sua hiperglicemia, reposição de enzimas digestivas para a insuficiência exócrina pancreática e acompanhamento de possíveis déficits nutricionais decorrentes dela.

Probando 3 (MODY Não GCK) – Variante região promotora *HNF1A*: c.-285C>T

O probando 3 apresenta uma história típica de DM monogênico tipo MODY não GCK: 1- idade de início do DM antes dos 30 anos, peptídeo C detectável três anos após o diagnóstico de DM e histórico familiar de DM em três gerações consecutivas. Além disso, é notória a grande sensibilidade ao uso da classe medicamentosa sulfonilureia: apresentou hipoglicemias pelo uso de glibenclamida em doses habituais

(dois comprimidos por dia) e ausência de resposta terapêutica às outras classes de antidiabéticos orais (metformina, inibidores de DPP4 e iSGLT2). Os dados de seguimento em longo prazo demonstraram a manutenção de boa resposta à sulfa por aproximadamente dez anos de uso. Variantes no *HNF1A* e *HNF4A* são causas já descritas de MODY sensíveis à sulfa em baixa dose ¹³¹. Por essas considerações, a variante encontrada em heterozigose em região promotora do *HNF1A* (c.-285C>T) foi priorizada.

Ao todo, até 2021, pelo banco de dados do HGMD (*The Human Gene Mutation Database*) 14 variantes em região promotora do *HNF1A* já tinham sido descritas associadas a MODY. Segundo revisão de Colclough, Kevin, de 2013 ⁴⁵, a região promotora do *HNF1A* compreende até 300 pares de base antes do códon de iniciação de transcrição. Esta região altamente conservada possui sítios de ligação preditos para outros fatores de transcrição como o HNF4A e o próprio HNF1A específicos dos tecidos pancreáticos e hepáticos ⁵⁴. A variante do probando 2 se situa no sítio de ligação do HNF4A ²²⁷, onde já existem variantes próximas (c.-283A>C) com estudos funcionais, demonstrando diminuição do nível de transcrição basal do HNF1A ⁵⁴. O fenótipo desses pacientes na literatura variou ^{45,54} com idades ao diagnóstico de hiperglicemia entre 4 anos e 32 anos de idade (a maioria entre 26 anos e 32 anos) e amplo espectro de tratamentos (de somente orientações dietéticas a antidiabéticos orais e insulina).

É interessante notar que a história familiar (Figura 21) do probando 3, apesar de rica em casos de DM, não é compatível com DM monogênico. Da família paterna, observamos somente o pai com histórico de pré-DM após os 35 anos, associado ao peso limítrofe para sobrepeso e comorbidades metabólicas importantes (tabagismo, DLP, HAS e IAM). Em relação à família materna, evidenciamos uma história típica de DM2, todos os indivíduos diagnosticados com pré-DM em vigência de obesidade, inclusive a mãe, revertendo o DM em um período restrito de perda de peso.

Em suma, a reanálise tanto genotípica quanto fenotípica, neste caso, permitiu um aconselhamento genético mais preciso ao caso índice, principalmente, ao orientar a manutenção do tratamento com sulfa para sua hiperglicemia. Além de permitir um seguimento clínico mais próximo do seu filho, portador da mesma variante.

Probando 7 (Lipodistrofia parcial) – Variante mitocondrial: m.8344A>G

A variante m.8344A>G foi originalmente descrita em 1990²²⁸ como causadora da síndrome MERRF (*Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fiber Disease*): uma patologia mitocondrial multissistêmica caracterizada por mioclonia, convulsões, ataxia cerebelar e miopatia mitocondrial com “fibras vermelhas irregulares”. Esta variante se situa no gene mitocondrial *MTTK* que codifica o RNA transportador de lisina (tRNA^{Lys}). Ao alterar a síntese proteica mitocondrial, esta variante resulta em mau funcionamento nos complexos da cadeia respiratória, especialmente o complexo citocromo-oxidase IV²²⁹.

É interessante notar que, desde a sua descoberta em 1990 até os dias atuais, ocorreu uma extensa expansão fenotípica relacionada a esta variante mitocondrial. A literatura, agora, aponta para uma ampla gama de possibilidades fenotípicas: 1- DM com surdez neurossensorial²³⁰; 2- lipomatose múltipla sistêmica²³¹; 3- hipertensão arterial sistêmica com surdez neurossensorial e DM²³²; 4- distúrbios psiquiátricos como humor depressivo e psicose²³³; 5- cardiomiopatia e arritmias cardíacas (Wolff-Parkinson-White)²³⁴. Além disso, uma gama de outras manifestações fenotípicas evidenciadas em revisão recente incluem o hipotireoidismo, sintomas gastrointestinais e até eventos cerebrovasculares: apontando para uma sobreposição de fenótipos com a variante m.3243A>G^{235,236}.

O probando 7 foi originalmente classificado como LPD parcial familiar, uma vez que apresentava sinais compatíveis com essa condição: 1- Distribuição e gordura preferencialmente truncal. 2- Aparente diminuição de gordura em extremidades. 3- DM com resistência insulínica manifesta (acantose nigricante, SOP, altas doses de insulino-terapia, alopecia androgenética, hirsutismo facial). 4- Dislipidemia. Essas características preenchem os critérios do consenso²⁰⁴ para suspeita clínica de LPD parcial familiar. No entanto, após uma reanálise de seus dados de sequenciamento e a priorização da variante m.8344A>G, o fenótipo de distribuição de gordura foi igualmente reavaliado e reclassificado como lipomatose múltipla sistêmica. Além disso, o probando 7 foi encaminhado para acompanhamento multidisciplinar, como de

hábito em patologias mitocondriais, com cardiologia, neurologia e otorrinolaringologia. A partir daí seu fenótipo foi reafirmado pela biópsia muscular com padrão histopatológico característico de doença mitocondrial, além da identificação de novos achados clínicos: surdez neurossensorial moderada, miopatia proximal, fadiga, déficit cognitivo, ataxia sensorial e anormalidades cardíacas (arritmia). Todos achados fenotípicos possíveis e característicos relacionados à variante m.84344A>G²³⁵. Este probando demonstra a importância da reanálise dos dados genéticos como auxílio no melhor entendimento do fenótipo do paciente, assim como aconselhamento genético mais preciso.

A relação entre função mitocondrial, tecido adiposo e resistência insulínica é promissora para o entendimento da fisiopatologia do diabetes mellitus. Do ponto de vista molecular, Kobayashi e colaboradores²³⁷ demonstraram que a função mitocondrial preservada é fundamental para um tecido adiposo saudável. Esse autor aponta que defeitos no mecanismo de reparo para proteínas mitocondriais mal empacotadas (UPR^{mi}) em adipócitos pode induzir atrofia do tecido adiposo e resistência à obesidade induzida por dieta. Além disso, mais evidências apontam que defeitos mitocondriais causam tanto dificuldade na função das células beta pancreáticas (insulinopenia)²³⁰ quanto prejuízo na sinalização do receptor de insulina (resistência insulínica)²³⁸⁻²⁴⁰.

Do ponto de vista clínico, em recente revisão²⁰⁵, genes nucleares (*LIPE* e *MFN2*) com relevância para o funcionamento mitocondrial adequado e a variante m.8344A>G foram apontadas como causadoras de síndromes lipodistróficas associados à lipomatose múltipla sistêmica. Entretanto, o autor aponta que, especificamente no caso variante m.8344A>G, os dados eram escassos que corroborassem comprometimento metabólico associado. Dessa forma, o quadro clínico do probando 7 se destaca, pois evidencia uma variante mitocondrial causando não somente lipomatose múltipla sistêmica como também DM insulino resistente secundário a um padrão lipodistrófico de distribuição de gordura.

Este é mais um caso que a reanálise fenotípica e genotípica teve grande impacto no aconselhamento genético da probando. Principalmente porque permitiu um melhor diagnóstico clínico (a paciente não só possui LPD parcial como também DM

mitocondrial) o que foi fundamental para o rastreo e tratamento de forma precoce das diversas comorbidades relacionadas a sua patologia molecular de base ao passar a realizar acompanhamento multidisciplinar com outras especialidades médicas.

5.2.2 Achados moleculares pouco prováveis de explicarem o fenótipo

Ao todo, 5 variantes (Tabela 9) foram identificadas com pouca probabilidade de serem causadoras do fenótipo suspeito: 2 foram identificadas em fenótipos pouco típicos para MODY e 3 em fenótipos típicos para MODY.

Dentre as duas identificadas em fenótipos poucos típicos, uma delas (probando 1) é uma pequena deleção intrônica em heterozigose no gene *GCK* em um probando que muito provavelmente possui hiperglicemia secundária à magreza e cuja segregação familiar não acrescentaria informações adicionais. De toda forma, esta variante ficou classificada como VUS. O probando 6 apresentou uma variante tipo inserção *inframe* em heterozigose no *RFX6*, cuja classificação é VUS pela atualização da literatura em relação a defeitos moleculares no *RFX6*, apontando que somente variantes do tipo nonsense são causadores de MODY.

Dentre as demais 3 variantes em fenótipos classificados como típicos para MODY, uma delas (probando 4) é uma missense em heterozigose no gene *WFS1*, classificada como VUS, principalmente pela revisão da literatura que aponta somente variantes em homozigose ou heterozigose compostas como possíveis causadoras de MODY. O probando 5 apresentou uma variante missense em heterozigose no *CEL*, classificada como provavelmente benigna, tanto pela segregação familiar não concordante com o fenótipo quanto pela revisão da literatura, apontando que a variante missense no *CEL* não é um mecanismo de defeito molecular causador de MODY. O probando 8 apresentou uma variante tipo deleção em CNV no gene *GATA6*, classificada como VUS, uma vez que a literatura não aponta defeitos moleculares no *GATA6* como causador de MODY.

Todos estes casos serão discutidos em detalhes a seguir.

Probando 1 (MODY GCK) – Variante intrônica profunda em deleção no GCK: c.864-279_864-271del

O probando 1 apresenta um quadro de hiperglicemia leve e sustentada durante seguimento clínico (dos 33 aos 41 anos de idade), com níveis laboratoriais de glicemia de jejum e HbA1c compatíveis com Pré DM, o que pode ser considerado uma suspeita para MODY-GCK. Entretanto, este fenótipo se torna menos provável, uma vez que a paciente diagnosticou este quadro somente aos 33 anos em exames de rotina. Sabe-se que o indivíduo com MODY-GCK apresenta hiperglicemia desde o nascimento¹⁵⁰ e, em nossa coorte¹⁴⁰, a média de idade do diagnóstico de hiperglicemia foi em torno de 8 anos de idade em 82 casos índices e 27 anos de idade em 108 familiares. A idade avançada (após os 30 anos), apesar de não excluir a possibilidade de MODY-GCK, faz-nos questionar se outros comemorativos clínicos poderiam estar influenciando esta leve hiperglicemia. Um fato que pode estar contribuindo para a hiperglicemia deste probando e de seu filho é o baixo peso, entretanto as evidências científicas que corroboram essa associação são pouco robustas^{185,241-242}.

Do ponto de vista molecular, a variante em deleção em região intrônica profunda do *GCK* passou a ser pouco valorizada, uma vez que o fenótipo da paciente é pouco típico para MODY-GCK, assim como até o presente momento deste estudo, nenhuma variante em deleção intrônica profunda se mostrou causadora de MODY-GCK. O que se tem descrito até o momento²⁴³ é uma deleção de 23 pares de base que engloba a região fronteira entre o intron 8 e exon 9 e portanto, engloba o sítio canônico de splicing. A segregação desta variante poderia ter sido realizada no filho com história de hiperglicemia leve, mas pouco acrescentaria. Isso ocorre pelo fato de o filho ter apresentado algumas glicemias de jejum entre 80 e 90 mg/dL, o que não é compatível com MODY-GCK.

Dessa forma, esta variante permanece como VUS sem a possibilidade de acrescentar pontuação a mais pela segregação familiar e que, mesmo que fossem realizados estudos funcionais, a somatória desta pontuação (PS3) não seria suficiente para elevar sua patogenicidade para provavelmente patogênica. Mais tempo de seguimento do probando seria interessante para avaliar uma possível melhora da

hiperglicemia com o ganho de peso e normalização de seu IMC. Além disso, este é um caso que nos faz refletir, que mesmo apresentando idade jovem ao diagnóstico de hiperglicemia, alta pontuação pelo *MODY calculator* e, portanto, sendo classificado como típico para MODY, ao aprofundarmos com mais detalhe sua descrição fenotípica, notamos outros comemorativos (no caso aqui, a possibilidade de hiperglicemia secundária à magreza) que podem tornar menos provável a causa monogênica para seu fenótipo.

Probando 6 (MODY não GCK) – Variante deleção *inframe* no *RFX6*: c.1494_1495insGGA

O probando 6 apresenta um fenótipo pouco típico para MODY, pois, apesar de ter sido diagnosticado com hiperglicemia jovem (aos 22 anos de idade), pontuou baixo na calculadora MODY (1,9%) pois precisou de insulinoaterapia desde diagnóstico de DM, além de não possuir histórico familiar de DM. Estes dois comemorativos clínicos nos fazem pensar que mais provavelmente se trata de um DM tipo 1 em que a ausência de história familiar de DM e a insulinopenia desenvolvida nos primeiros 5 anos de diagnóstico de DM é típico ²⁴⁴.

Do ponto de vista molecular, o *RFX6* é um membro da família de fatores de transcrição do fator regulatório X (RFX), crucialmente importante para o desenvolvimento de células beta pancreáticas ²⁴⁵. Com variantes em homozigose, originalmente, no ano de 2010, é descrito como causador de diabetes neonatal síndromico associado à hipoplasia/agenesia pancreática, atresia intestinal e atresia de vesícula biliar: síndrome de Mitchell-Riley ²⁴⁶. Em 2017, Patel e colaboradores ⁹⁸ relataram o primeiro caso de MODY em idade mais avançada (em torno de 30 anos), secundário à variante nonsense em heterozigose no gene *RFX6*. Desde então, múltiplos relatos de caso ^{247,248}, assim como publicações mais robustas com 13 probandos ^{47,48}; todas descrevem casos de MODY secundários variantes nonsense no *RFX6*, tornando este mecanismo molecular como o único muito provavelmente possível para esta correlação genótipo/fenótipo. A variante encontrada no probando 6, apesar de rara, por ser uma deleção *inframe*, não altera o quadro de leitura da proteína e, portanto, não causa um códon prematuro de parada: muito provavelmente não é causadora do fenótipo de DM deste paciente. Esta variante então ficou classificada como do tipo VUS, principalmente, pois seu mecanismo de defeito molecular está em discordância com o que a literatura defende para o *RFX6* (variantes nonsense, somente), assim como seu fenótipo mais característico para DM tipo 1.

A reanálise deste caso permitiu a este um melhor aconselhamento clínico, uma vez que enfatizou a possibilidade de se tratar um DM tipo 1. Futuramente, para melhor

entendimento do mecanismo molecular envolvido, este probando pode se beneficiar de uma análise de risco poligênico para DM tipo 1 ²⁴⁹.

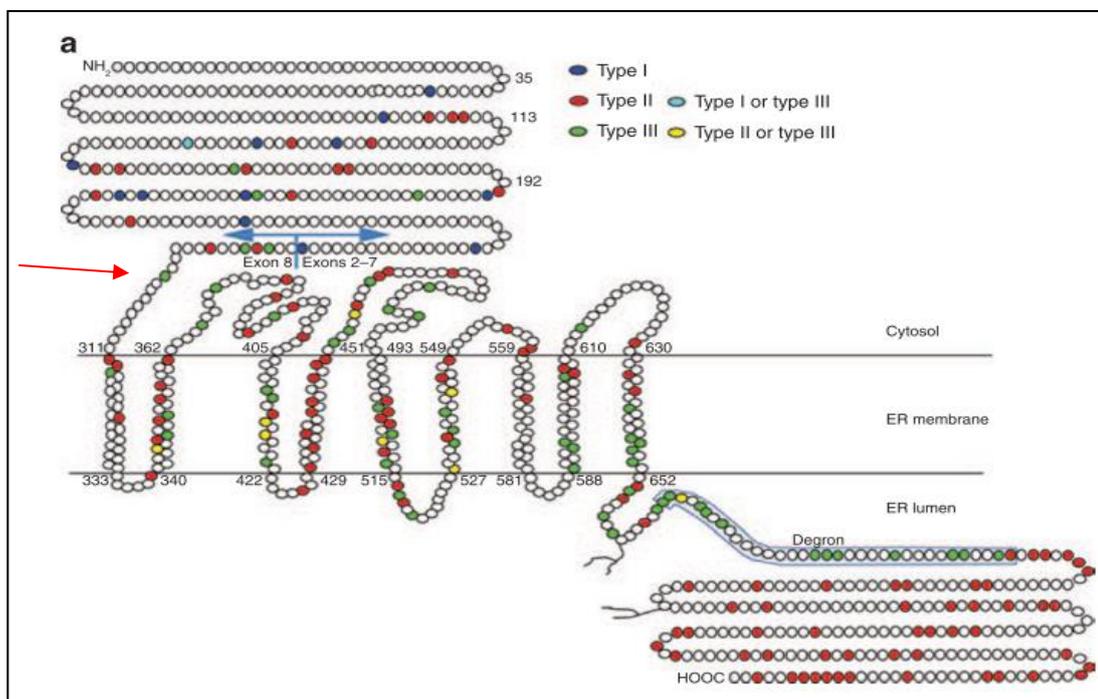
Probando 4 (MODY Não GCK) – Variante missense no *WFS1* c.911T>C

O probando 4 foi classificado como típico para MODY pois sua idade jovem ao diagnóstico de DM (aos 17 anos de idade) e o fato de apresentar bom controle glicêmico dois anos após, sem qualquer tratamento farmacológico, gerou alta pontuação pelo MODY *calculator* (75,5%), mesmo que tudo isto tenha ocorrido em vigência de sobrepeso. Entretanto, alguns pontos dessa história merecem melhor reflexão que podem aproximá-la mais de um DM tipo 2 do que um DM monogênico. De início, importante lembrarmos que os pacientes com MODY raramente apresentam cetoacidose, nem sobrepeso no diagnóstico de sua hiperglicemia ^{136,250}. Em paralelo, essa importante história de glicotoxicidade e insulinopenia ao diagnóstico (cetoacidose), com necessidade de insulino-terapia por 4 meses, seguido de melhora importante do controle glicêmico que se manteve estável por 2 anos sem tratamento farmacológico (HbA1c de 5,4% com peptídeo C de 3,08 ng/dL), faz-nos pensar em um diabetes propenso à cetose ²⁵¹. Sendo este um provável subtipo de DM tipo 2, cuja incidência vem aumentando nos últimos anos pelo aumento concomitante da incidência de DM tipo 2 em adolescentes e adultos jovens ¹⁸⁹. É característico deste quadro clínico, o diagnóstico de DM em vigência de marcada hiperglicemia, glicotoxicidade, eventualmente cetoacidose que necessita de insulino-terapia e sinais de resistência insulínica, como o sobrepeso da nossa paciente. Após semanas ou meses de controle glicêmico adequado em insulino-terapia, esses indivíduos são capazes de descontinuar o tratamento com insulina e manter bom controle apenas com dieta e/ou antidiabéticos orais. A história de DM em família materna é insuficientemente detalhada o que auxilia pouco no entendimento do caso índice. A avó materna se assemelha mais a um quadro de DM tipo 2 diagnosticado aos 67 anos, enquanto a mãe, diagnosticada aos 24 anos, pode se tratar tanto de um MODY quanto um DM tipo 2, a depender de melhor descrição fenotípica que não foi possível pela impossibilidade de contato para reconvocação desta família.

De toda forma, o probando foi selecionada como caso típico para MODY e uma variante missense em heterozigose foi identificada: *WFS1*(NM_006005.3):c.911T>C (p.Ile304Thr). O gene *WFS1* transcreve a proteína transmembrana wolfranina composta pela calda N-terminal na região do citosol, nove domínios transmembrana e extremidade carboxiterminal situada no lúmen do retículo endoplasmático. Além disso, possui domínio funcional *degron* (região fundamental para reconhecimento e degradação de wolfranina mal empacotadas durante processo de síntese proteica), situado na porção citosólica (Figura 41) ²⁵². É altamente expressa no sistema nervoso central, coração e células beta pancreáticas. Possui um mecanismo molecular controverso: 1- Participa no processo pós-translacional de empacotamento de proteínas recém-sintetizadas (incluindo a insulina). 2- Promove o equilíbrio de concentrações de cálcio intracelular (citosol). 3- É responsável pelo equilíbrio de sinalizações dependentes de cálcio nos retículos endoplasmáticos associados a mitocôndrias (MAMs – *mitochondrial associated endoplasmatic reticulum membranes*) ²⁵³. Em última análise, perdas no funcionamento da wolfranina geram estresse do retículo endoplasmático, interrupção da síntese proteica, apoptose celular, resultante do acúmulo de proteínas mal empacotadas.

As variantes podem ser separadas em três tipos maiores, segundo revisão da literatura ²⁵² (Figura 41). As do tipo 1 são aquelas que sofrem o processo de decaimento nonsense por apresentarem um *stop* códon prematuro, portanto, antes do éxon 8. As do tipo 2 são aquelas que promovem um defeito na proteína que a leva à degradação completa por manter o domínio *degron* (671-700) intacto: são as missenses que ocorrem fora do domínio *degron* e aquelas nonsenses que ocorrem após o domínio *degron*. As do tipo 3 são as que transcrevem uma proteína mais curta ou defeituosa: são as missenses entre 671-700 (impedem a degradação de uma wolfranina defeituosa); mutações nonsense antes do códon 700 e após o éxon 8 (proteína truncada); mutações frameshift que introduzem um códon de parada após o éxon 8 (proteína truncada). Segundo esta revisão, as mutações mais comuns são as do tipo 2 (55,61%) seguidas do tipo 3 (38,2%) e tipo 1 (5,62%) ²⁵².

Figura 41 - Representação esquemática da proteína wolfranina e localização das variantes já identificadas na literatura



Seta vermelha: localização da variante da Probanda 4 (p.Ile304Thr)

Fonte retirada de PMID 23429432

A descrição de variantes no gene *WFS1* como causadoras de MODY é mais recente. As duas principais publicações^{47,48} neste tema apontam que variantes missenses em homozigose ou heterozigose composta no *WFS1*, em sua maioria situadas no exon 8, são causadoras de MODY-não GCK. Ao todo, estas duas publicações relataram 21 probandos com este tipo de defeito molecular. Em contrapartida, uma única publicação¹⁰³ revelou um probando com variante missense em heterozigose no *WFS1* que segregou com fenótipo de MODY em uma família. A maioria dessas variantes, assim como a encontrada pelo nosso caso são classificadas como tipo 2: levam um defeito na proteína que promove sua destruição completa. No caso de nossa probando, a variante fica classificada como VUS, por ser rara (PM2 *supporting*) e possuir alta pontuação no preditor *in silico* REVEL (PP3 *supporting*). A patogenicidade desta variante se manteria como VUS se acrescida de estudos funcionais (PS3 *moderate*) e segregação familiar (PP1 *supporting*). A reconvocação da paciente e seus familiares não foi possível pela perda de contato durante

seguimento. De toda forma, acreditamos que o fenótipo da paciente seja mais típico para DM tipo 2, assim como, do ponto de vista molecular, variantes em heterozigose na *WFS1*, parecem não ter se sustentado na literatura como uma causa possível de MODY. Certamente, para melhor compreensão futura do mecanismo molecular envolvido neste DM, a classificação em escore de risco poligênico para DM tipo 2²⁵⁴ é de grande valia.

Probando 5 (MODY GCK) – Variante missense no *CEL* c.296A>C

O probando 5 apresenta uma história clínica típica para MODY-GCK: hiperglicemia leve e estável por 13 anos sem necessidade de tratamento farmacológico para tal, sendo manejado com dieta. Este longo período de 13 anos de permanência em pré-DM de forma estável corrobora para a suspeita de MODY-GCK. Estudo prospectivo em adultos em torno de 35 anos de idade com pré-DM que foram seguidos por 10 anos, demonstrou uma incidência de conversão de pré-DM em DM de até 58,9%²⁵⁵. Uma vez que o DM em idades mais jovens tende a progredir mais rapidamente para falência pancreática¹⁸⁹, não esperaríamos manutenção deste pré-DM no probando 5 por tão longo período, a não ser que se trate de um caso de MODY-GCK. Entretanto, é notória a dislipidemia à custa de elevação do LDL diagnosticada quando jovem aos 9 anos de idade sem outros comemorativos metabólicos que pudessem justificá-la. Este quadro se mantém até os dias atuais, no qual o probando, aos 18 anos de idade, com IMC de 22,4 faz uso de alta potência farmacológica hipolipemiante (rosuvastatina 20 mg com ezetimibe 10 mg), mantendo um LDL, ainda algo elevado, de 115 mg/dL. Possui histórico familiar materno (Figura 26) igualmente rico para dislipidemia à custa de LDL, assim como eventos tromboembólicos arteriais e venosos. A história de DM ocorre tanto do lado materno quanto paterno. O pai com quadro mais semelhante ao DM tipo 2 e a família materna também apresenta, em sua maioria, quadros de DM que lembram o tipo 2. Nenhum destes familiares apresentou história típica para MODY-GCK como a do caso índice, o que torna provável uma sobreposição de fenótipos diferentes relacionadas a DM nesta família. Do ponto de vista de função exócrina, tanto o probando quanto sua mãe apresentaram dosagens de

elastase fecal e imagem pancreática normais. A atual variante não segregou de forma positiva na família para o fenótipo de DM nem para o fenótipo de dislipidemia e/ou eventos tromboembólicos (Figura 26).

Do ponto de vista molecular, a carboxil ester lipase (CEL) é uma enzima presente em todos os vertebrados examinados até então ²⁵⁶, sendo uma das 4 lipases secretadas pelo pâncreas ao duodeno, mas somente a CEL necessita de ativação pelos ácidos biliares. Por isso, também chamada de lipase estimulada pelos ácidos biliares. A CEL representa 4% do total de proteína detectada no suco pancreático e é principalmente expressa nas células acinares deste órgão. A proteína CEL é formada por uma região repetitiva em sua porção C-terminal, sendo mais comumente encontrada 16 repetições correspondendo a uma proteína composta por 722 aminoácidos. Sendo esta porção postulada por ser importante para secreção e atividade proteica ²⁵⁷. Em sua porção N-terminal, situa-se o peptídeo sinalizador contendo 23 aminoácidos, o qual, quando removido, permite sua entrada no retículo endoplasmático, onde se empacotará com chaperonas e formará um complexo proteico. Subsequentemente, a CEL é transportada ao complexo de Golgi, onde seus aminoácidos repetitivos são glicosilados, aumentando sua estabilidade e impedindo a degradação por danos proteolíticos. Após completamente glicosilada, é translocada ao intestino pela via secretória associada a outras enzimas pancreáticas. É reportado na literatura que uma fração da proteína CEL sofre endocitose do intestino para o compartimento sanguíneo, onde parcialmente se associa à lipoproteína, contendo Apolipoproteína-B (ApoB) ^{258,259}. As variantes descritas nas regiões de VNTRs que geram uma proteína truncada, acarretariam uma proteína instável pela menor disponibilidade de sítios de glicosilação, sendo alvo de destruição proteolítica ²⁶⁰. A proteína CEL é transcrita pelo gene *CEL* que é localizado no cromossomo 11 e consiste em 11 exons, sendo que o último exon possui uma região de variações de cópia repetidas em tandem (VNTR) rica em GC, composta por praticamente idênticos segmentos de 33 pares de base. Esta região torna o gene muito polimórfico, uma vez que repetições entre 3 a 23 vezes foram observadas (sendo a mais frequente, possuindo tamanho de 16 repetições) ²⁶¹. A primeira descrição do MODY-CEL ocorreu em 2006 com a descrição de 2 casos índices afetados por DM e insuficiência exócrina ²⁶⁰. Em uma das famílias, 3 dos 14 indivíduos tinham diagnóstico de DM antes dos 25 anos, o

restante antes dos 40 anos. Além disso, muitos membros possuíam insuficiência exócrina caracterizados por deficiência na elastase fecal. Através de estudo de ligação, foi identificada uma região do gene *CEL* que segregava com estes dois fenótipos, esta que, quando sequenciada foi identificada uma deleção c.1686del (p.Thr563fs) de um par de base, gerando um códon de parada prematuro no último exon 11. Exon este caracterizado por VNTR (variando de 11 a 22 repetições) de 33 pares de base, cada um codificando 11 aminoácidos. Esta deleção alteraria a primeira repetição, gerando um comprometimento de toda esta região a justante e conseqüentemente da proteína transcrita por esta região repetitiva. Nesta primeira família, todos os portadores da variante possuíam elastase fecal diminuída de forma severa (<100 ug/g) ou moderadamente (100-200 ug/g), sendo que 10 indivíduos que realizaram tomografia computadorizada de pâncreas que possuíam DM e insuficiência exócrina, apresentavam liposubstituição do tecido pancreático. Sendo assim, aventa-se que o MODY-CEL é uma doença causada por mal empacotamento proteico conseqüente de mutações ganhadoras de função com efeito dominante negativo sobre as proteínas saudáveis²⁶⁸⁻²⁷⁰. Até o momento, somente variantes em deleção pontual na região do VNTR do gene *CEL* se consagram como possibilidade para gerarem fenótipos patogênicos (tanto DM quanto pancreatite/insuficiência exócrina). Portanto, a literatura aponta que variantes missenses, como a do nosso probando 5, devem ser interpretadas com cautela, necessitando de robustos estudos funcionais e segregacionais em grandes famílias, a fim de provarem sua patogenicidade²⁶⁵. Em relação ao fenótipo marcante de dislipidemia e eventos trombóticos nesta família, a literatura, apesar de pouco robusta, apresenta alguma relação. Estudos *in vitro* demonstram relação de enzimas lipase dependente de bile (como a *CEL*) com aterogênese²⁶⁶⁻²⁶⁸, assim como um único estudo associou polimorfismos em variação do número de VNTR no *CEL* e dislipidemia²⁶⁹.

A reanálise do probando 5 se mostrou de acordo com a literatura vigente sobre o entendimento do gene *CEL*: a variante missense, apesar de rara (*PM2 supporting*) e pontuação elevada no *REVEL* (*PP3 supporting*) não segregou (*BS4 strong*) com fenótipo de DM nem com fenótipo de dislipidemia/eventos trombóticos. Este caso reforça que variantes missenses (*BP1 supporting*) no *CEL* muito pouco provavelmente são causadores de MODY, assim como dislipidemia/eventos trombóticos. Para melhor

explicar o fenótipo deste probando, estudos moleculares abordando genes relacionados à dislipidemia primária são importantes, assim como a investigação de CNVs no gene *GCK* por outra metodologia como o MLPA ou CGH-array.

**Probando 8 (MODY não GCK) – Variante tipo deleção CNV no *GATA6*
chr18:g.19780797_19780917del**

O probando 8 foi selecionado como um fenótipo típico para MODY, pois diagnosticou DM jovem (12 anos de idade) associada à pontuação elevada no *MODY calculator* (75,5%). Entretanto, uma reflexão mais profunda, principalmente em relação ao seu seguimento clínico e histórico familiar nos faz pensar que o DM tipo 2 deve ser considerado como diagnóstico diferencial. É notório ressaltar que a paciente diagnosticou DM aos 12 anos de idade com sobrepeso, quando precisou de tratamento farmacológico para a hiperglicemia. Entretanto, à medida que normalizou o peso, passou a apresentar perfil glicêmico compatível com normalidade, em uso irregular de baixas doses de gliclazida (dos 13 aos 16 anos) ou mesmo sem qualquer tratamento farmacológico (dos 16 aos 21 anos). Por outro lado, aos 22 anos de idade, quando reganha peso e atinge o sobrepeso novamente, apresentou franca hiperglicemia, necessitando de tratamento farmacológico. Esta oscilação da glicemia associado a variações de peso levanta a hipótese de se tratar de um DM tipo 2, mostrando que a resistência insulínica aqui exerce um forte papel fisiopatológico no desenvolvimento da hiperglicemia. A literatura possui robusta evidência de que variações no peso em estágios iniciais do DM tipo 2 comprovadamente podem gerar remissão do DM^{270,271}, e vice versa. Em paralelo, do ponto de vista familiar (Figura 31), com exceção da mãe que diagnosticou DM durante gestação aos 24 anos, a idade avançada do diagnóstico de DM em três familiares maternos após os 47 anos de idade torna pouco provável que esta família carregue uma variante de alta herdabilidade causadora monogênica para DM.

Do ponto de vista molecular, os fatores de transcrição GATA constituem uma família de proteínas regulatórias da transcrição expressa em perfis específicos de tecidos e de desenvolvimento distintos embrionários, regulando assim padrões de

expressão gênica. O GATA6 possui papel fundamental no desenvolvimento em estágios iniciais de múltiplos órgãos: pâncreas, coração, ovário, pulmão e fígado ²⁷². Em 2011 Allen e colaboradores ²⁷³ descreveram os primeiros 14 casos de DMN associados à agenesia pancreática causados por variantes em heterozigose do tipo missense ou deleção em *frameshift* em regiões codificadoras do gene *GATA6*. Desde então, um amplo acometimento fenotípico tem sido relacionado ao *GATA6*: mal formação cardíaca, má formação do trato gastro intestinal ou biliar, assim como, mais raramente, MODY ^{192,274,275}. Até o momento não há descrição de variante em região 3 UTR no *GATA6* como causadora de algum fenótipo.

Para melhor entendimento deste caso, um estudo de risco poligênico para DM tipo 2 ²⁵⁴ no probando seria útil, assim como a investigação de mal formações de órgãos características do acometimento no *GATA6*. A segregação familiar teria pouca valia, uma vez que somente um indivíduo foi diagnosticado com DM jovem, antes dos 30 anos e o restante possui um fenótipo típico para DM2. Desta forma, esta variante permanece com variante de significado incerto pontuando -0,3 seguintes motivos: 1B (-0,6) variante situada em uma região que não é codificadora de proteína OU não tem nenhum elemento funcional conhecido relevante; 4C (+0,3), o fenótipo reportado é consistente com a região genômica, mas não altamente específica e/ou com alta heterogeneidade genética; 5F (0) informação sobre herança não disponível ou não informativa.

5.2.3 Reinterpretação de variantes do tipo VUS

A reanálise foi capaz de reclassificar 5 variantes VUS, que foram aventadas como possíveis causadoras do fenótipo do probando; todas foram rebaixadas para benigna (4/5) ou provavelmente benigna (1/5). Esse majoritário rebaixamento na patogenicidade de variantes durante o processo de reanálise é algo esperado como aponta a literatura ^{112,126,276}, principalmente pelo aumento do número de indivíduos sequenciados em bancos de dados populacionais públicos ¹⁵⁵. As variantes passam a apresentar novas frequências alélicas que são maiores do que a esperada para a frequência da doença. Do ponto de vista do DM monogênico, a publicação do MDEP em 2021 ¹⁵¹ com pontos de cortes muito bem definidos em relação a pontuações no

ACMG e frequência alélica de variantes foi um marco importante, principalmente para MODY, que permitiu a reclassificação de todas as variantes VUS do atual estudo. Neste trabalho, uma frequência alélica $\geq 0,01\%$ define a pontuação BA1 *stand alone*; BS1 *supporting* é definido pela frequência $\geq 0,004\%$ (variantes no *GCK*) ou $\geq 0,0033\%$ (variante no *HNF1A* e *HNF4A*) e PM2 *supporting* para frequências $\leq 0,002\%$. Como MODY causado por variantes no *GCK*, *HNF1A* e *HNF4A* são os fenótipos mais comuns dentre os indivíduos com DM monogênico, entendemos que as variantes encontradas nos demais genes, devem, no mínimo respeitar esses filtros de frequência de raridade para terem patogenicidade considerada. Interessante notar a importância do aumento da representatividade de indivíduos provenientes de populações miscigenadas, como a brasileira, no total de indivíduos sequenciados. Dos 5 probandos com variantes VUS, 4 foram reclassificados como nível mais baixo, e pouco passível de questionamentos, de benignidade pela pontuação BA1 *stand alone* adquirida por frequências alélicas elevadas em nosso banco de dados populacionais o ABraOM¹⁶⁰. Este fato nos faz pensar que possam ser variantes enriquecidas em nossa população miscigenada, pois, como resumido na Tabela 9, podemos notar uma grande discrepância da frequência alélica dessas variantes no ABraOM e gnomAD.

Do ponto de vista de estudos segregacionais destas variantes VUS, 3 probandos (probando 9, probando 11 e probando 12) possuíam familiares disponíveis para este estudo. Todos os estudos não forneceram dados positivos adicionais relevantes em relação à patogenicidade da variante. No caso do probando 9, com fenótipo típico para MODY, ao todo 3 familiares afetados com hiperglicemia não possuíam a variante, tornando-a menos provável de ser causadora do fenótipo na família. O probando 11 possui um fenótipo pouco típico para MODY e, também, a variante segregou em um familiar igualmente pouco provável se tratar de MODY. Por fim, apesar do probando 12 possuir um fenótipo típico para MODY, a variante segregou em familiar com provável DM tipo 2 (DM diagnosticado aos 76 anos de idade). Dessa forma, podemos refletir que a segregação familiar, durante um processo de reanálise de VUS, deve sempre ser posterior a uma análise detalhada da nova frequência alélica que, eventualmente, a variante adquiriu com o passar do tempo. Assim como, dada a alta e crescente incidência de DM tipo 2 na população geral, uma fenotipagem profunda dos

familiares faz-se fundamental a fim de tornar os estudos de segregação relevantes em DM monogênico.

5.2.4 Variantes extrínsecas à reanálise direta

Ao todo, dois pacientes (probando 14 e 15) tiveram seu diagnóstico molecular estabelecido por outros métodos de sequenciamento e não pelos dados reanalisados do tNGS. Ambos probandos possuem fenótipos classificados como típicos pela reanálise, sendo um característico para MODY GCK (probando 14) e o segundo para LPD parcial familiar (probando 15).

Como não foi encontrada nenhuma variante que explicasse o fenótipo após o processo de reanálise do probando 14, este prosseguiu sua investigação molecular por estudo do exoma em trio (probando, pai e mãe) em outro projeto de pesquisa interno do nosso grupo ¹⁷¹. Neste estudo, o preparo das bibliotecas de DNAs do pai e da mãe foi proveniente da nova coleta de sangue periférico, enquanto no probando, o processo de extração e amplificação por PCR do DNA foi feito a partir da mesma amostra de sangue periférico utilizada para o tNGS. Esta análise identificou uma variante missense em heterozigose no *GCK* na mãe e não no pai e nem no probando 14. Ao prosseguir com recoleta de nova amostra de DNA do probando 14 e realização do sequenciamento por Sanger destas 4 amostras (amostra antiga do probando 14, amostra nova do probando 14, amostra do pai e da mãe – Figura 38), identificou-se a variante corretamente no probando e na mãe. Ilustra-se aqui a possibilidade de erro de amostra, por exemplo, falha na rotulagem ¹⁹⁶, como uma causa de falso negativo em estudos de investigação molecular. Esta variante *GCK* (NM_000162.5):c.127C>A (p.Arg43Ser) por ser rara em bancos de dados populacionais (PM2 *supporting*), ter sido encontrada em um probando com fenótipo típico para MODY GCK (PP4 *supporting*), ser uma nova variante missense em um aminoácido em outras variantes missenses diferentes que já foram estabelecidas como patogênicas (PM5 *strong*), ser uma variante missense em um gene que não tolera este tipo de variante (PP2 *supporting*) e pontuação no REVEL de 0,8 (PP3 *supporting*) foi então classificada como provavelmente patogênica.

O probando 15 apresentou uma resolução para seu diagnóstico molecular mais comum durante o processo de reanálise: nova associação gene/doença. Apesar de os estudos em reanálise apresentarem metodologias distintas, esta é apontada como a principal causa de novos achados moleculares durante o processo de reanálise¹²⁴. A variante no gene *MFN2* foi encontrada por sequenciamento em um novo painel de genes para LPD parcial familiar externo ao nosso grupo de pesquisa. Este probando apresentou um fenótipo típico para LPD parcial familiar, uma vez que possui baixo percentual de gordura em MMII, comorbidades metabólicas relacionadas à resistência insulínica, mas possui um achado adicional não comum em pacientes com este fenótipo: lipomatose. Do ponto de vista molecular, o gene *MFN2* é traduzido em mitofusina-2, uma proteína transmembrana da membrana externa mitocondrial cuja oligomerização é responsável pela fusão mitocondrial²⁷⁷. Inicialmente descrita como causadora de neuropatia de Charcot-Marie-Tooth em 2004²⁷⁸, somente mais recentemente em 2017/2018^{279,280} que variantes em homozigose ou heterozigose composta no *MFN2* foram definidas como causadoras do fenótipo de LDP parcial com lipomatose. Esta expansão fenotípica ocorreu posterior à escolha dos genes para o nosso painel cuja segunda versão mais atualizada ocorreu em 2015 e, portanto, não contemplou o *MFN2*. Do ponto de vista de etiopatogenia, os defeitos mitocondriais, o estresse oxidativo e aumento da expressão de alguns marcadores termogênicos no tecido adiposo justificam o elo entre lipodistrofia e disfunção mitocondrial associado ao *MFN2*. Pensamento fisiopatológico semelhante ao ocorrido, com probando 7 que também possui disfunção mitocondrial pela variante m.8344A>G, associado a LPD parcial e lipomatose. Em resumo, a variante *MFN2* (NM_014874.4):c.2119C>T em homozigose foi classificada como provavelmente patogênica pelos seguintes motivos: possui robustos estudos funcionais (PS3 *strong*); rara em bancos de dados populacionais (PM2 *supporting*), possui outra variante missense no mesmo aminoácido já descrita como patogênica (PM5 *moderate*), pontuou 0,8 no REVEL (PP3 *supporting*). Este caso reforça a importância da atualização pela literatura científica para as novas associações genes/doença que, de forma constante e progressivamente mais rápida, ocorrem ao longo do tempo.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A reanálise combinada fenotípica e genotípica foi capaz de aumentar a acurácia diagnóstica molecular em uma coorte de indivíduos com suspeita clínica de diabetes monogênico sem etiologia molecular prévia em aproximadamente 9 a 26% de forma geral. Os indivíduos com suspeita de LPD parcial familiar foram os mais beneficiados com incremento de 26,03% em seu diagnóstico, seguido pelo incremento de 24,68% nos indivíduos com suspeita de DMN, 16,67% nos indivíduos com suspeita de MODY-GCK e 9,93% naqueles com suspeita de MODY-não GCK. Este incremento foi à custa tanto de novos achados moleculares antes não visualizados como na melhor capacidade em excluir casos pouco típicos para doença monogênica.

A partir dos mecanismos pelos quais os novos achados moleculares foram identificados, o atual trabalho destaca a importância da melhor compreensão do papel das regiões regulatórias (promotoras e *enhancers*) como possíveis causadoras de DM monogênico, assim como no genoma mitocondrial.

Este estudo também permitiu a identificação da variante mitocondrial de ponto m.8344A>G como provável nova causa de LPD parcial familiar, além de ter destacado a possibilidade, pouco relatada na literatura em reanálise molecular, de um falso negativo ser causado por provável falha humana em erro de rotulagem de amostra de DNA.

Em suma, o atual trabalho mostra que as combinações dos estudos de reanálise fenotípica e genotípica e a troca de informações bidirecionais entre eles potencializou o aumento da acurácia diagnóstica molecular dos diversos fenótipos de DM monogênico.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

ANEXO 1 – Critérios para seleção dos diversos fenótipos de DM monogênico utilizados por projetos anteriores

Critérios de seleção de probandos com MODY

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.

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.

- 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).

Crítérios 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:
 - Anticorpos anti-células beta negativos ou em baixos títulos;
 - Peptídeo C detectável após 3 anos do diagnóstico de DM.

Crítérios de seleção de probandos com DMN

Os critérios clínico-laboratoriais utilizados para seleção dos pacientes com **DMN** foram os mesmos baseados em trabalho prévio do nosso grupo e literatura, sendo:

Crítérios de inclusão

DM associado a uma ou mais das condições:

- Diagnóstico < 6 meses.
- Diagnóstico entre 6 meses e 12 meses (com autoanticorpos relacionados ao DM negativos).
- Diagnóstico < 6 meses ou entre 6 e 12 meses e com autoanticorpos relacionados ao DM positivo, sexo masculino, associado à diarreia crônica, eczema, tireoidite, nefropatia ou doenças hematológicas.

Critérios de seleção de probandos com LPD parcial familiar

Critérios de inclusão

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

ou

- Perda de tecido subcutâneo, tipicamente ocorrendo durante ou após a puberdade, acometendo extremidades e, ou região glútea, poupando ou levando ao acúmulo de gordura na face, pescoço ou região intra-abdominal que podem estar associadas às seguintes condições:
- Presença de diabetes com evidência de resistência insulínica grave:
 - Diabetes *mellitus* que requer altas doses de insulina, por exemplo, ≥ 200 UI/dia ou ≥ 2 UI/kg/dia.
 - Diabetes cetose-resistente.
 - Acantose nigricante.
 - Síndrome dos Ovários Policísticos ou sintomas semelhantes (hiperandrogenismo, oligomenorreia e, ou ovários policísticos).
- Presença de hipertrigliceridemia:
 - Grave (Triglicérides (TG) >500 mg/dL).
 - Níveis de TG que não respondem à terapia e, ou modificação dietética (≥ 250 mg/dL).
 - História de pancreatite associada à hipertrigliceridemia.
- Evidência de esteatose hepática ou esteato-hepatite:

- Hepatomegalia e/ou aumento de transaminases na ausência de causa conhecida de doença hepática, podendo ser consistente com doença hepática não alcoólica gordurosa.
 - Evidência radiográfica de esteatose hepática.
- História familiar de aparência física similar e, ou de perda de gordura.
 - Musculatura proeminente e flebomegalia nas extremidades.
 - Hiperfagia desproporcional (não parar de comer, acordar para comer, brigar por comida)
 - Hipogonadismo secundário em homens e amenorreia primária ou secundária em mulheres

Critérios de exclusão

- Antecedente de paniculite
- Uso de antirretrovirais

Critérios de seleção de probandos com Síndrome de Wolfram

Critérios de inclusão

- Diabetes com autoanticorpos relacionados ao DM negativo e
- Atrofia óptica bilateral que podem estar associados às seguintes condições:
 - Surdez neurossensorial
 - Diabetes insípidos
 - Doença ulcerosa péptica
 - Diátese hemorrágica

ANEXO 2 - Genes nucleares contemplados pela primeira versão do painel

<i>INS</i>	<i>KLF11</i>	<i>CAVI</i>	<i>GLIS3</i>	<i>PLAGL1</i>	<i>SLC2A2</i>
<i>PDX1</i>	<i>GCK</i>	<i>CIDEA</i>	<i>GLUD1</i>	<i>PLIN1</i>	<i>STAT3</i>
<i>KCNJ11</i>	<i>HNFA1A</i>	<i>CISD2</i>	<i>HADH</i>	<i>PPARG</i>	<i>TBC1D4</i>
<i>ABCC8</i>	<i>HNFA4A</i>	<i>CP</i>	<i>IER3IP1</i>	<i>PTF1A</i>	<i>WFS1</i>
<i>HNFB1B</i>	<i>NEUROD1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>INSR</i>	<i>PTRF</i>	<i>ZFP57</i>
<i>PAX4</i>	<i>AGPAT2</i>	<i>FOXP3</i>	<i>LMNA</i>	<i>RFX6</i>	<i>ZMPSTE24</i>
<i>BLK</i>	<i>AKT2</i>	<i>GATA4</i>	<i>HYMAI</i>	<i>SLC16A1</i>	
<i>CEL</i>	<i>BSCL2</i>	<i>GATA6</i>	<i>NEUROG3</i>	<i>SLC19A2</i>	

Em negrito: genes com região intrônica completa contempladas

ANEXO 3 - Genes nucleares contemplados pela segunda versão do painel

<i>INS</i>	<i>KLF11</i>	<i>CAV1</i>	<i>GLIS3</i>	<i>PLAGL1</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>*NKX2-2</i>
<i>PDX1</i>	<i>GCK</i>	<i>CIDEA</i>	<i>GLUD1</i>	<i>PLIN1</i>	<i>STAT3</i>	<i>*PAX6</i>
<i>KCNJ11</i>	<i>HNFI1A</i>	<i>CISD2</i>	<i>HADH</i>	<i>PPARG</i>	<i>TBC1D4</i>	<i>*APPL1</i>
<i>ABCC8</i>	<i>HNFI4A</i>	<i>CP</i>	<i>IER3IP1</i>	<i>PTF1A</i>	<i>WFS1</i>	
<i>HNFI1B</i>	<i>NEUROD1</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>INSR</i>	<i>PTRF</i>	<i>ZFP57</i>	
<i>PAX4</i>	<i>AGPAT2</i>	<i>FOXP3</i>	<i>LMNA</i>	<i>RFX6</i>	<i>ZMPSTE24</i>	
<i>BLK</i>	<i>AKT2</i>	<i>GATA4</i>	<i>HYMAI</i>	<i>SLC16A1</i>	<i>*AIRE</i>	
<i>CEL</i>	<i>BSCL2</i>	<i>GATA6</i>	<i>NEUROG3</i>	<i>SLC19A2</i>	<i>*MNX1</i>	

Em negrito: genes com região intrônica completa e promotora contempladas

*Genes novos adicionados à segunda versão do painel

ANEXO 4 – Metodologia utilizada no sequenciamento em larga escala (SLE)

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 ²⁸¹. 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.

Dados do sequenciamento em larga escala (SLE)

O painel foi construído com o uso da ferramenta *Agilent Sure Design* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA) e incluiu 51 genes nucleares já previamente associados aos diferentes tipos de diabetes monogênico [11 genes de MODY, sendo 4 genes associados somente a MODY (*HNF4A*, *HNF1A*, *CEL*, *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 autoimune (*FOXP3*, *AIRE*, *STAT3*), 2 genes associados à síndrome de Wolfram (*WFS1*, *CISD2*), 1 gene associado às síndromes de resistência insulínica (*INSR*), 11 genes de lipodistrofia (*AGPAT2*, *BSCL2*, *CAVI*, *PTRF*, *LMNA*, *PLIN1*, *ZMPSTE24*, *AKT2*, *CIDEA*, *TBC1D4*, *PPARG*), 3 genes associados à hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar – HHF (*HADH*, *GLUD1*, *SLC16A1*), em adição ao genoma mitocondrial. Os genes relacionados à hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar foram incluídos como potenciais candidatos a novos casos

de MODY e DMN, uma vez que também transcrevem proteínas relacionadas à homeostase glicêmica.

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).

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 homopolímeros²⁸², e por ser a tecnologia dominante na atualidade, suportada pelas principais ferramentas de bioinformática.

Etapas do SLE

O processo de SLE compreendeu três etapas fundamentais:

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.

ANEXO 5 - Genes nucleares contemplados pelo painel da disciplina de endocrinologia da FMUSP

<i>ABCC8</i>	<i>GATA4</i>	<i>KLF11</i>	<i>PPARG</i>
<i>ACADVL</i>	<i>GATA6</i>	<i>LIPE</i>	<i>PTF1A</i>
<i>AGL</i>	<i>GCK</i>	<i>LMNA</i>	<i>PTRF</i>
<i>AGPAT2</i>	<i>GLIS3</i>	<i>LMNB2</i>	<i>RFX6</i>
<i>AKT2</i>	<i>GLUD1</i>	<i>MNX1</i>	<i>SLC16A1</i>
<i>APPL1</i>	<i>GYS2</i>	<i>NEUROD1</i>	<i>SLC19A2</i>
<i>BLK</i>	<i>HADH</i>	<i>NEUROG3</i>	<i>SLC2A2</i>
<i>BSCL2</i>	<i>HMGA1</i>	<i>NKX2-2</i>	<i>SLC37A4</i>
<i>CAV1</i>	<i>HNF1A</i>	<i>PAX4</i>	<i>STAT3</i>
<i>CEL</i>	<i>HNF1B</i>	<i>PAX6</i>	<i>TBC1D4</i>
<i>CIDEA</i>	<i>HNF4A</i>	<i>PC</i>	<i>UCP2</i>
<i>CISD2</i>	<i>HYMAI</i>	<i>PCK1</i>	<i>WFS1</i>
<i>CP</i>	<i>IER3IP1</i>	<i>PCYT1A</i>	<i>ZFP57</i>
<i>EIF2AK3</i>	<i>INS</i>	<i>PDX1</i>	<i>ZMPSTE24</i>
<i>FBP1</i>	<i>INSR</i>	<i>PIK3R1</i>	
<i>FLNB</i>	<i>IRS1</i>	<i>PLAGL1</i>	
<i>FOXP3</i>	<i>IRS2</i>	<i>PLIN1</i>	
<i>G6PC</i>	<i>KCNJ11</i>	<i>POLD1</i>	

ANEXO 6 - Critérios da ACMG para classificação de patogenicidade das variantes alélicas

Critério muito forte de patogenicidade	
PVS1	<i>Null variant</i> : 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 <i>de novo</i> em um paciente com doença sem história familiar (com paternidade confirmada).
PS3	Presença de estudos funcionais (<i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>) 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 <i>de novo</i> , sem confirmação da paternidade.
Critérios suporte 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 6 - Critérios da ACMG para classificação de patogenicidade das variantes alélicas (conclusão)

Critério benigno independente	
BA1	Frequência alélica maior que 5% nos bancos de dados populacionais (1000Genomes, 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 splicing.
BS4	Ausência de segregação em membros afetados da família.
Critérios de suporte de benignidade	
BP1	Variante missense em um gene no qual variantes com perda de função (LoF) são mecanismos conhecidos de doença.
BP2	Variante detectada em trans com uma variante patogênica para um gene dominante com penetrância completa ou observada em cis com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança.
BP3	Deleções ou inserções in-frame em região repetitiva sem função conhecida.
BP4	Várias ferramentas computacionais sugerindo ausência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no splicing 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 splicing não predizem impacto na sequência consenso de splice, nem a criação de um novo sítio de splice, e o nucleotídeo não é altamente conservado.

ANEXO 8 Descrição fenotípica resumida dos indivíduos excluídos da reanálise

Probando	Suspeita clínica	Idade ao Dx (anos)	MODY <i>calculator</i> (%)	Motivo da exclusão	Tempo de seguimento (anos)
1	MODY GCK	5	75,5	Hiperglicemia transitória da infância	7
2	MODY não GCK	7	75,5	Hiperglicemia transitória da infância*	7
3	MODY GCK	11	75,5	Hiperglicemia transitória da infância	5
4	MODY GCK	11	75,5	Hiperglicemia transitória da infância**	7
5	MODY GCK	13	75,5	Hiperglicemia transitória da infância	5
6	MODY GCK	22	75,5	Hiperglicemia Transitória Resolvida	12
7	MODY GCK	25	75,5	Hiperglicemia na Gestação	5
8	MODY GCK	28	75,5	Hiperglicemia Transitória Resolvida***	7
9	MODY GCK			Sem dados clínicos	
10	MODY não GCK			Sem dados clínicos	
11	MODY não GCK			Sem dados clínicos	
12	DMN			Sem dados clínicos	

Dx: diagnóstico

*doença autoimune em uso intermitente de imunomoduladores e/ou corticoide

**terapia de reposição com GH para déficit de crescimento.

*** IMC = 19 com baixa massa gorda e baixa massa magra evidenciada em densitometria de corpo inteiro.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Hod M, Kapur A, Sacks DA, Hadar E, Agarwal M, Di Renzo GC, Roura LC, McIntyre HD, Morris JL, Divakar H. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015;131 Suppl 3:S173-S211.
2. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL, Kahan S, Khunti K, Leon J, Lyons SK, Perry ML, Prahalad P, Pratley RE, Seley JJ, Stanton RC, Gabbay RA, on behalf of the American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care.* 2023;46(Suppl 1):S19-S40.
3. Flannick J, Johansson S, Njølstad PR. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(7):394-406.
4. Shields BM, Shepherd M, Hudson M, McDonald TJ, Colclough K, Peters J, Knight B, Hyde C, Ellard S, Pearson ER, Hattersley AT; UNITED study team. Population-Based assessment of a biomarker-based screening pathway to aid diagnosis of monogenic diabetes in young-onset patients. *Diabetes Care.* 2017;40(8):1017-25.
5. Yeung RO, Hannah-Shmouni F, Niederhoffer K, Walker MA. Not quite type 1 or type 2, what now? Review of monogenic, mitochondrial, and syndromic diabetes. *Rev Endocr Metab Disord.* 2018;19(1):35-52.
6. Rubio-Cabezas O, Hattersley AT, Njølstad PR, Mlynarski W, Ellard S, White N, Chi DV, Craig ME; International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2014;15 Suppl 20:47-64.
7. Hattersley AT, Greeley SAW, Polak M, Rubio-Cabezas O, Njølstad PR, Mlynarski W, Castano L, Carlsson A, Raile K, Chi DV, Ellard S, Craig ME. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of

monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2018;19 Suppl 27:47-63.

8. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*. 2001;345(13):971-80.

9. Lachance CH. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. *Can J Diabetes*. 2016;40(5):368-75.

10. Shepherd M, Sparkes AC, Hattersley AT. Genetic testing in maturity onset diabetes of the young (MODY): a new challenge for the diabetic clinic. *Pract Diabetes Int*. 2001;18(1):16-21.

11. Ellard S, Lango Allen H, De Franco E, Flanagan SE, Hysenaj G, Colclough K, Houghton JA, Shepherd M, Hattersley AT, Weedon MN, Caswell R. Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing. *Diabetologia*. 2013;56(9):1958-63.

12. Rubio-Cabezas O, Ellard S. Diabetes mellitus in neonates and infants: genetic heterogeneity, clinical approach to diagnosis, and therapeutic options. *Horm Res Paediatr*. 2013;80(3):137-46.

13. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT; European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) MODY group. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*. 2008;51(4):546-53.

14. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.

15. Kwak SH, Jung CH, Ahn CH, Park J, Chae J, Jung HS, Cho YM, Lee DH, Kim JI, Park KS. Clinical whole exome sequencing in early onset diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016;122:71-7.

16. Naylor RN, Greeley SAW, Huang ES. Cost-effectiveness of genetic testing for monogenic diabetes. In: Weiss RE, Refetoff S. (ed.) *Genetic diagnosis of endocrine disorders*. 2nd ed. Academic Press, Elsevier; 2016. Cap. 27. p. 389-396.

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;53(12):2504-8.
18. Kleinberger JW, Pollin TI. Undiagnosed MODY: Time for Action. *Curr Diab Rep*. 2015;15(12):110.
19. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT. Beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes*. 2001;50 Suppl 1:S94-100.
20. Santana LS, Caetano LA, Costa-Riquetto AD, Quedas EPS, Nery M, Collett-Solberg P, Boguszewski MCS, Vendramini MF, Crisostomo LG, Floh FO, Zarabia ZI, Kohara SK, Guastapaglia L, Passone CGB, Sewaybricker LE, Jorge AAL, Teles MG. Clinical application of ACMG-AMP guidelines in HNF1A and GCK variants in a cohort of MODY families. *Clin Genet*. 2017;92(4):388-96.
21. Shepherd M, Ellis I, Ahmad AM, Todd PJ, Bowen-Jones D, Mannion G, Ellard S, Sparkes AC, Hattersley AT. Predictive genetic testing in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med*. 2001;18(5):417-21.
22. Fajans SS, Bell GI. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care*. 2011;34(8):1878-84.
23. Bowman P, Flanagan SE, Edghill EL, Damhuis A, Shepherd MH, Paisey R, Hattersley AT, Ellard S. Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. *Diabetologia*. 2012;55(1):123-7.
24. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Dechaume A, Huyvaert M, Montagne L, Marre M, Balkau B, Fajardy I, Vambergue A, Vatin V, Delplanque J, Le Guilcher D, De Graeve F, Lecoeur C, Sand O, Vaxillaire M, Froguel P. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PLoS One*. 2012;7(6):e37423.
25. Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A, Ludovico O, Buranasupkajorn P, Mazza T, Hastings T, Milano T, Morini E, Mercuri L, Bailetti D, Mendonca C, Alberico F, Basile G, Romani M, Miccinilli E, Pizzuti A, Carella M, Barbetti F,

- Pascarella S, Marchetti P, Trischitta V, Di Paola R, Doria A. Loss-of-function mutations in APPL1 in familial diabetes mellitus. *Am J Hum Genet.* 2015;97(1):177-85.
26. 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;55(5):1265-72.
27. Santomauro AC Jr, Magalhães ÁLF, Motta FT, de Santana LS, Franco PC, de Freitas SM, Sanchez JJD, Costa-Riquetto AD, Teles MG. The performance of the MODY calculator in a non-Caucasian, mixed-race population diagnosed with diabetes mellitus before 35 years of age. *Diabetol Metab Syndr.* 2023;15(1):15.
28. Costa-Riquetto AD, de Santana LS, Franco PC, Jr ACS, Martio AE, Lisboa HRK, Kohara SK, Teles MG. Genetic and clinical features of neonatal and early onset diabetes mellitus in a tertiary center cohort in Brazil. *Clin Genet.* 2023;103(4):434-47.
29. Gurgel LC, Moisés RS. Diabetes melito neonatal [Neonatal diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(2):181-7.
30. Şıklar Z, de Franco E, Johnson MB, Flanagan SE, Ellard S, Ceylaner S, Boztuğ K, Doğu F, İkinciogulları A, Kuloğlu Z, Kansu A, Berberoğlu M. Monogenic diabetes not caused by mutations in Mody genes: a very heterogenous group of diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2018;126(10):612-8.
31. Gloyn AL, Reimann F, Girard C, Edghill EL, Proks P, Pearson ER, Temple IK, Mackay DJ, Shield JP, Freedenberg D, Noyes K, Ellard S, Ashcroft FM, Gribble FM, Hattersley AT. Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum Mol Genet.* 2005;14(7):925-34.
32. Babenko AP, Polak M, Cavé H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Vaxillaire M, Froguel P. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2006;355(5):456-66.
33. Edghill EL, Flanagan SE, Patch AM, Boustred C, Parrish A, Shields B, Shepherd MH, Hussain K, Kapoor RR, Malecki M, MacDonald MJ, Støy J, Steiner DF, Philipson LH, Bell GI; Neonatal Diabetes International Collaborative Group;

- Hattersley AT, Ellard S. Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. *Diabetes*. 2008;57(4):1034-42.
34. Støy J, Greeley SA, Paz VP, Ye H, Pastore AN, Skowron KB, Lipton RB, Cogen FR, Bell GI, Philipson LH; United States Neonatal Diabetes Working Group. Diagnosis and treatment of neonatal diabetes: a United States experience. *Pediatr Diabetes*. 2008;9(5):450-9.
35. Russo L, Iafusco D, Brescianini S, Nocerino V, Bizzarri C, Toni S, Cerutti F, Monciotti C, Pesavento R, Iughetti L, Bernardini L, Bonfanti R, Gargantini L, Vanelli M, Aguilar-Bryan L, Stazi MA, Grasso V, Colombo C, Barbetti F; ISPED Early Diabetes Study Group. Permanent diabetes during the first year of life: multiple gene screening in 54 patients. *Diabetologia*. 2011;54(7):1693-701.
36. Brown RJ, Araujo-Vilar D, Cheung PT, Dunger D, Garg A, Jack M, Mungai L, Oral EA, Patni N, Rother KI, von Schnurbein J, Sorkina E, Stanley T, Vigouroux C, Wabitsch M, Williams R, Yorifuji T. The diagnosis and management of lipodystrophy syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(12):4500-11.
37. Garg A. Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med*. 2004;350(12):1220-34.
38. Hegele RA. Premature atherosclerosis associated with monogenic insulin resistance. *Circulation*. 2001;103(18):2225-9.
39. Vazier C, Vantyghem MC, Storey C, Jéru I, Christin-Maitre S, Fève B, Lascols O, Bertrand J, Carel JC, Vigouroux C, Bismuth E. Monogenic forms of lipodystrophic syndromes: diagnosis, detection, and practical management considerations from clinical cases. *Curr Med Res Opin*. 2019;35(3):543-52.
40. Frayling TM, Lindgren CM, Chevre JC, Menzel S, Wishart M, Benmezroua Y, Brown A, Evans JC, Rao PS, Dina C, Lecoeur C, Kanninen T, Almgren P, Bulman MP, Wang Y, Mills J, Wright-Pascoe R, Mahtani MM, Prisco F, Costa A, Cagnet I, Hansen T, Pedersen O, Ellard S, Tuomi T, Groop LC, Froguel P, Hattersley AT, Vaxillaire M. A genome-wide scan in families with maturity-onset diabetes of the young: evidence for further genetic heterogeneity. *Diabetes*. 2003;52(3):872-81.

41. de Santana LS, Caetano LA, Costa-Riquetto AD, Franco PC, Dotto RP, Reis AF, Weinert LS, Silveiro SP, Vendramini MF, do Prado FA, Abrahão GCP, de Almeida AGFP, Tavares MDGR, Gonçalves WRB, Santomauro Junior AC, Halpern B, Jorge AAL, Nery M, Teles MG. Targeted sequencing identifies novel variants in common and rare MODY genes. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(12):e962.
42. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, Ellard S, Gloyn AL. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat.* 2009;30(11):1512-26.
43. Carmody D, Park SY, Ye H, Perrone ME, Alkorta-Aranburu G, Highland HM, Hanis CL, Philipson LH, Bell GI, Greeley SA. Continued lessons from the INS gene: an intronic mutation causing diabetes through a novel mechanism. *J Med Genet.* 2015 Sep;52(9):612-6.
44. Flanagan SE, Xie W, Caswell R, Damhuis A, Vianey-Saban C, Akcay T, Darendeliler F, Bas F, Guven A, Siklar Z, Ocal G, Berberoglu M, Murphy N, O'Sullivan M, Green A, Clayton PE, Banerjee I, Clayton PT, Hussain K, Weedon MN, Ellard S. Next-generation sequencing reveals deep intronic cryptic ABCC8 and HADH splicing founder mutations causing hyperinsulinism by pseudoexon activation. *Am J Hum Genet.* 2013;92(1):131-6.
45. 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;34(5):669-85.
46. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):253-68.
47. Colclough K, Ellard S, Hattersley A, Patel K. Syndromic monogenic diabetes genes should be tested in patients with a clinical suspicion of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes.* 2022;71(3):530-7.
48. Saint-Martin C, Bouvet D, Bastide M, Bellanné-Chantelot C. Gene Panel Sequencing of Patients With Monogenic Diabetes Brings to Light Genes Typically Associated With Syndromic Presentations. *Diabetes.* 2022 Mar 1;71(3):578-584.

49. ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*. 2004;306(5696):636-40.
50. Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, Chen Y, Zhao X, Schmidl C, Suzuki T, Ntini E, Arner E, Valen E, Li K, Schwarzfischer L, Glatz D, Raithel J, Lilje B, Rapin N, Bagger FO, Jørgensen M, Andersen PR, Bertin N, Rackham O, Burroughs AM, Baillie JK, Ishizu Y, Shimizu Y, Furuhashi E, Maeda S, Negishi Y, Mungall CJ, Meehan TF, Lassmann T, Itoh M, Kawaji H, Kondo N, Kawai J, Lennartsson A, Daub CO, Heutink P, Hume DA, Jensen TH, Suzuki H, Hayashizaki Y, Müller F, Forrest ARR, Carninci P, Rehli M, Sandelin A. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*. 2014;507(7493):455-61.
51. Rojano E, Seoane P, Ranea JAG, Perkins JR. Regulatory variants: from detection to predicting impact. *Brief Bioinform*. 2019;20(5):1639-54.
52. Edwards SL, Beesley J, French JD, Dunning AM. Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *Am J Hum Genet*. 2013;93(5):779-97.
53. Komazec J, Ristivojevic B, Zukic B, Zdravkovic V, Karan-Djurasevic T, Pavlovic S, Ugrin M. Analysis of the promoter regions of disease-causing genes in maturity-onset diabetes of the young patients. *Mol Biol Rep*. 2020;47(9):6759-68.
54. Godart F, Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Gragnoli C, Abderrahmani A, Blanché H, Boutin P, Chèvre JC, Froguel P, Bailleul B. Identification of seven novel nucleotide variants in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (TCF1) promoter region in MODY patients. *Hum Mutat*. 2000;15(2):173-80.
55. Galán M, García-Herrero CM, Azriel S, Gargallo M, Durán M, Gorgojo JJ, Andía VM, Navas MA. Differential effects of HNF-1 α mutations associated with familial young-onset diabetes on target gene regulation. *Mol Med*. 2011;17(3-4):256-65
56. Radha V, Ek J, Anuradha S, Hansen T, Pedersen O, Mohan V. Identification of novel variants in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in South Indian patients with maturity onset diabetes of young. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(6):1959-65.

57. Gasperíková D, Tribble ND, Staník J, Hucková M, Misovicová N, van de Bunt M, Valentínová L, Barrow BA, Barák L, Dobránsky R, Bereczková E, Michálek J, Wicks K, Colclough K, Knight JC, Ellard S, Klimes I, Gloyn AL. Identification of a novel beta-cell glucokinase (GCK) promoter mutation (-71G>C) that modulates GCK gene expression through loss of allele-specific Sp1 binding causing mild fasting hyperglycemia in humans. *Diabetes*. 2009;58(8):1929-35.
58. Rissanen J, Saarinen L, Heikkinen S, Kekäläinen P, Mykkänen L, Kuusisto J, Deeb SS, Laakso M. Glucokinase gene islet promoter region variant (G-->A) at nucleotide -30 is not associated with reduced insulin secretion in Finns. *Diabetes Care*. 1998;21(7):1194-7.
59. Wirsing A, Johnstone KA, Harries LW, Ellard S, Ryffel GU, Stanik J, Gasperikova D, Klimes I, Murphy R. Novel monogenic diabetes mutations in the P2 promoter of the HNF4A gene are associated with impaired function in vitro. *Diabet Med*. 2010;27(6):631-5.
60. Weedon MN, Cebola I, Patch AM, Flanagan SE, De Franco E, Caswell R, Rodríguez-Seguí SA, Shaw-Smith C, Cho CH, Allen HL, Houghton JA, Roth CL, Chen R, Hussain K, Marsh P, Vallier L, Murray A; International Pancreatic Agenesis Consortium; Ellard S, Ferrer J, Hattersley AT. Recessive mutations in a distal PTF1A enhancer cause isolated pancreatic agenesis. *Nat Genet*. 2014;46(1):61-4.
61. Sibley CR, Blazquez L, Ule J. Lessons from non-canonical splicing. *Nat Rev Genet*. 2016;17(7):407-21.
62. Three C. Human genome variation. *Nat Genet*. 2014;46(11):1153.
63. Chabot B, Shkreta L. Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J Cell Biol*. 2016;212(1):13-27.
64. Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, Cooper DN. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat*. 2007;28(2):150-8.
65. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, Adams DR, Altman RB, Antonarakis SE, Ashley EA, Barrett JC, Biesecker LG, Conrad DF, Cooper GM, Cox NJ, Daly MJ, Gerstein MB, Goldstein DB, Hirschhorn

- JN, Leal SM, Pennacchio LA, Stamatoyannopoulos JA, Sunyaev SR, Valle D, Voight BF, Winckler W, Gunter C. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*. 2014;508(7497):469-76.
66. Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2012;18(8):472-82.
67. Sterne-Weiler T, Sanford JR. Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code. *Genome Biol*. 2014;15(1):201.
68. Scotti MM, Swanson MS. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet*. 2016;17(1):19-32.
69. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*. 2007;8(10):749-61.
70. Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, Hua Y, Gueroussov S, Najafabadi HS, Hughes TR, Morris Q, Barash Y, Krainer AR, Jovic N, Scherer SW, Blencowe BJ, Frey BJ. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*. 2015;347(6218):1254806.
71. Hsiao YH, Bahn JH, Lin X, Chan TM, Wang R, Xiao X. Alternative splicing modulated by genetic variants demonstrates accelerated evolution regulated by highly conserved proteins. *Genome Res*. 2016;26(4):440-50.
72. Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet*. 2017;136(9):1093-111.
73. Ng YS, Taylor RW, Schaefer AM. Diabetes mellitus in mitochondrial disease. In: *Frontiers in diabetes*. Basel: United Kingdom: Karger; 2017. vol. 25. p. 55-68.
74. van den Ouweland JM, Lemkes HH, Trembath RC, Ross R, Velho G, Cohen D, Froguel P, Maassen JA. Maternally inherited diabetes and deafness is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Diabetes*. 1994;43(6):746-51.

75. van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet.* 1992;1(5):368-71.
76. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet.* 1992;1(1):11-5.
77. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, Feeney C, Horvath R, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, Taylor RW, Turnbull DM, McFarland R. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol.* 2015;77(5):753-9.
78. Whittaker RG, Schaefer AM, McFarland R, Taylor RW, Walker M, Turnbull DM. Prevalence and progression of diabetes in mitochondrial disease. *Diabetologia.* 2007;50(10):2085-9.
79. Ng YS, Lim AZ, Panagiotou G, Turnbull DM, Walker M. Endocrine manifestations and new developments in mitochondrial disease. *Endocr Rev.* 2022;43(3):583-609.
80. Takano C, Ogawa E, Hayakawa S. Insulin resistance in mitochondrial diabetes. *Biomolecules.* 2023;13(1):126.
81. McMillan RP, Stewart S, Budnick JA, Caswell CC, Hulver MW, Mukherjee K, Srivastava S. Quantitative variation in m.3243A>G mutation produce discrete changes in energy metabolism. *Sci Rep.* 2019;9(1):5752.
82. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6(5):389-402.
83. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, Maixner W, Diatchenko L. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science.* 2006;314(5807):1930-3.

84. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007;315(5811):525-8.
85. Sheikh TI, Mittal K, Willis MJ, Vincent JB. A synonymous change, p.Gly16Gly in MECP2 Exon 1, causes a cryptic splice event in a Rett syndrome patient. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:108.
86. Soukarieh O, Gaildrat P, Hamieh M, Drouet A, Baert-Desurmont S, Frébourg T, Tosi M, Martins A. Exonic splicing mutations are more prevalent than currently estimated and can be predicted by using in silico tools. *PLoS Genet*. 2016;12(1):e1005756.
87. Costantini S, Prandini P, Corradi M, Pasquali A, Contreas G, Pignatti PF, Pinelli L, Trabetti E, Maffei C. A novel synonymous substitution in the GCK gene causes aberrant splicing in an Italian patient with GCK-MODY phenotype. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;92(1):e23-6.
88. Igudin EL, Spirin PV, Prasolov VS, Zubkov NA, Petriakina EE, Tiul'pakov AN, Rubtsov PM. [Functional characterization of two novel splicing mutations in glucokinase gene in monogenic diabetes MODY2]. *Mol Biol (Mosk)*. 2014;48(2):288-94.
89. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet*. 2015;16(3):172-83.
90. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D986-92.
91. Firdous P, Nissar K, Ali S, Ganai BA, Shabir U, Hassan T, Masoodi SR. Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:253.
92. Iacocca MA, Hegele RA. Role of DNA copy number variation in dyslipidemias. *Curr Opin Lipidol*. 2018;29(2):125-32.

- 93 Berberich AJ, Huot C, Cao H, McIntyre AD, Robinson JF, Wang J, Hegele RA. Copy number variation in GCK in patients with maturity-onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(8):3428-36.
- 94 Björkman K, Vissing J, Østergaard E, Bindoff LA, de Coo IFM, Engvall M, Hikmat O, Isohanni P, Kollberg G, Lindberg C, Majamaa K, Naess K, Uusimaa J, Tulinius M, Darin N. Phenotypic spectrum and clinical course of single large-scale mitochondrial DNA deletion disease in the paediatric population: a multicentre study. *J Med Genet.* 2023;60(1):65-73.
- 95 Artuso R, Provenzano A, Mazzinghi B, Giunti L, Palazzo V, Andreucci E, Blasetti A, Chiuri RM, Gianiorio FE, Mandich P, Monami M, Mannucci E, Giglio S. Therapeutic implications of novel mutations of the RFX6 gene associated with early-onset diabetes. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(1):49-54.
- 96 Mitchell J, Punthakee Z, Lo B, Bernard C, Chong K, Newman C, Cartier L, Desilets V, Cutz E, Hansen IL, Riley P, Polychronakos C. Neonatal diabetes, with hypoplastic pancreas, intestinal atresia and gall bladder hypoplasia: search for the aetiology of a new autosomal recessive syndrome. *Diabetologia.* 2004;47(12):2160-7.
- 97 Patel KA, Kettunen J, Laakso M, Stančáková A, Laver TW, Colclough K, Johnson MB, Abramowicz M, Groop L, Miettinen PJ, Shepherd MH, Flanagan SE, Ellard S, Inagaki N, Hattersley AT, Tuomi T, Cnop M, Weedon MN. Heterozygous RFX6 protein truncating variants are associated with MODY with reduced penetrance. *Nat Commun.* 2017;8(1):888.
- 98 Akiba K, Ushijima K, Fukami M, Hasegawa Y. A heterozygous protein-truncating RFX6 variant in a family with childhood-onset, pregnancy-associated and adult-onset diabetes. *Diabet Med.* 2020;37(10):1772-6.
- 99 Chausseot A, Rouzier C, Quere M, Plutino M, Ait-El-Mkadem S, Bannwarth S, Barth M, Dollfus H, Charles P, Nicolino M, Chabrol B, Vialettes B, Paquis-Flucklinger V. Mutation update and uncommon phenotypes in a French cohort of 96 patients with WFS1-related disorders. *Clin Genet.* 2015;87(5):430-9.
- 100 Eiberg H, Hansen L, Kjer B, Hansen T, Pedersen O, Bille M, Rosenberg T, Tranebjaerg L. Autosomal dominant optic atrophy associated with hearing impairment

and impaired glucose regulation caused by a missense mutation in the WFS1 gene. *J Med Genet.* 2006;43(5):435-40.

101 Rendtorff ND, Lodahl M, Boulahbel H, Johansen IR, Pandya A, Welch KO, Norris VW, Arnos KS, Bitner-Glindzicz M, Emery SB, Mets MB, Fagerheim T, Eriksson K, Hansen L, Bruhn H, Möller C, Lindholm S, Ensgaard S, Lesperance MM, Tranebjaerg L. Identification of p.A684V missense mutation in the WFS1 gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(6):1298-313.

102 Bai X, Lv H, Zhang F, Liu J, Fan Z, Xu L, Han Y, Chai R, Li J, Wang H. Identification of a novel missense mutation in the WFS1 gene as a cause of autosomal dominant nonsyndromic sensorineural hearing loss in all-frequencies. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(12):3052-60.

103 Bonnycastle LL, Chines PS, Hara T, Huyghe JR, Swift AJ, Heikinheimo P, Mahadevan J, Peltonen S, Huopio H, Nuutila P, Narisu N, Goldfeder RL, Stitzel ML, Lu S, Boehnke M, Urano F, Collins FS, Laakso M. Autosomal dominant diabetes arising from a Wolfram syndrome 1 mutation. *Diabetes.* 2013;62(11):3943-50.

104 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med.* 2013;15(9):733-47.

105 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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):405-24.

106 Wenger AM, Guturu H, Bernstein JA, Bejerano G. Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: implications for providers. *Genet Med.* 2017;19(2):209-14.

- 107 Deignan JL, Chung WK, Kearney HM, Monaghan KG, Rehder CW, Chao EC; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Points to consider in the reevaluation and reanalysis of genomic test results: a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2019;21(6):1267-70.
- 108 Farwell KD, Shahmirzadi L, El-Khechen D, Powis Z, Chao EC, Tippin Davis B, Baxter RM, Zeng W, Mroske C, Parra MC, Gandomi SK, Lu I, Li X, Lu H, Lu HM, Salvador D, Ruble D, Lao M, Fischbach S, Wen J, Lee S, Elliott A, Dunlop CL, Tang S. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med.* 2015;17(7):578-86.
- 109 Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, Vertino-Bell A, Smaoui N, Neidich J, Monaghan KG, McKnight D, Bai R, Suchy S, Friedman B, Tahiliani J, Pineda-Alvarez D, Richard G, Brandt T, Haverfield E, Chung WK, Bale S. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med.* 2016;18(7):696-704.
- 110 Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Leduc MS, Kirby A, Pham P, Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2013;369(16):1502-11.
- 111 Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, Das K, Toy T, Harry B, Yourshaw M, Fox M, Fogel BL, Martinez-Agosto JA, Wong DA, Chang VY, Shieh PB, Palmer CG, Dipple KM, Grody WW, Vilain E, Nelson SF. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA.* 2014;312(18):1880-7.
- 112 Hiatt SM, Amaral MD, Bowling KM, Finnila CR, Thompson ML, Gray DE, Lawlor JMJ, Cochran JN, Bebin EM, Brothers KB, East KM, Kelley WV, Lamb NE, Levy SE, Lose EJ, Neu MB, Rich CA, Simmons S, Myers RM, Barsh GS, Cooper GM. Systematic reanalysis of genomic data improves quality of variant interpretation. *Clin Genet.* 2018;94(1):174-8.

- 113 Xiao B, Qiu W, Ji X, Liu X, Huang Z, Liu H, Fan Y, Xu Y, Liu Y, Yie H, Wei W, Yan H, Gong Z, Shen L, Sun Y. Marked yield of re-evaluating phenotype and exome/target sequencing data in 33 individuals with intellectual disabilities. *Am J Med Genet A*. 2018;176(1):107-15.
- 114 Baker SW, Murrell JR, Nesbitt AI, Pechter KB, Balciuniene J, Zhao X, Yu Z, Denenberg EH, DeChene ET, Wilkens AB, Bhoj EJ, Guan Q, Dulik MC, Conlin LK, Abou Tayoun AN, Luo M, Wu C, Cao K, Sarmady M, Bedoukian EC, Tarpinian J, Medne L, Skraban CM, Deardorff MA, Krantz ID, Krock BL, Santani AB. Automated clinical exome reanalysis reveals novel diagnoses. *J Mol Diagn*. 2019;21(1):38-48.
- 115 Sun Y, Xiang J, Liu Y, Chen S, Yu J, Peng J, Liu Z, Chen L, Sun J, Yang Y, Yang Y, Zhou Y, Peng Z. Increased diagnostic yield by reanalysis of data from a hearing loss gene panel. *BMC Med Genomics*. 2019;12(1):76.
- 116 Robertson AJ, Tan NB, Spurdle AB, Metke-Jimenez A, Sullivan C, Waddell N. Re-analysis of genomic data: An overview of the mechanisms and complexities of clinical adoption. *Genet Med*. 2022;24(4):798-810.
- 117 Won D, Kim SH, Kim B, Lee ST, Kang HC, Choi JR. Reanalysis of Genomic Sequencing Results in a Clinical Laboratory: Advantages and Limitations. *Front Neurol*. 2020 Jun 30;11:612.
- 118 James KN, Clark MM, Camp B, Kint C, Schols P, Batalov S, Briggs B, Veeraraghavan N, Chowdhury S, Kingsmore SF. Partially automated whole-genome sequencing reanalysis of previously undiagnosed pediatric patients can efficiently yield new diagnoses. *NPJ Genom Med*. 2020;5:33.
- 119 Al-Nabhani M, Al-Rashdi S, Al-Murshedi F, Al-Kindi A, Al-Thihli K, Al-Saegh A, Al-Futaisi A, Al-Mamari W, Zadjali F, Al-Maawali A. Reanalysis of exome sequencing data of intellectual disability samples: Yields and benefits. *Clin Genet*. 2018;94(6):495-501.
- 120 Costain G, Jobling R, Walker S, Reuter MS, Snell M, Bowdin S, Cohn RD, Dupuis L, Hewson S, Mercimek-Andrews S, Shuman C, Sondheimer N, Weksberg R, Yoon G, Meyn MS, Stavropoulos DJ, Scherer SW, Mendoza-Londono R, Marshall CR. Periodic reanalysis of whole-genome sequencing data enhances the diagnostic

advantage over standard clinical genetic testing. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(5):740-44.

121 Ewans LJ, Schofield D, Shrestha R, Zhu Y, Gayevskiy V, Ying K, Walsh C, Lee E, Kirk EP, Colley A, Ellaway C, Turner A, Mowat D, Worgan L, Freckmann ML, Lipke M, Sachdev R, Miller D, Field M, Dinger ME, Buckley MF, Cowley MJ, Roscioli T. Whole-exome sequencing reanalysis at 12 months boosts diagnosis and is cost-effective when applied early in Mendelian disorders. *Genet Med.* 2018;20(12):1564-74.

122 Nambot S, Thevenon J, Kuentz P, Duffourd Y, Tisserant E, Bruel AL, Mosca-Boidron AL, Masurel-Paulet A, Lehalle D, Jean-Marçais N, Lefebvre M, Vabres P, El Chehadeh-Djebbar S, Philippe C, Tran Mau-Them F, St-Onge J, Jouan T, Chevarin M, Poé C, Carmignac V, Vitobello A, Callier P, Rivière JB, Faivre L, Thauvin-Robinet C; Orphanomix Physicians' Group. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of rare disorders with congenital anomalies and/or intellectual disability: substantial interest of prospective annual reanalysis. *Genet Med.* 2018;20(6):645-54.

123 Wright CF, McRae JF, Clayton S, Gallone G, Aitken S, FitzGerald TW, Jones P, Prigmore E, Rajan D, Lord J, Sifrim A, Kellsell R, Parker MJ, Barrett JC, Hurles ME, FitzPatrick DR, Firth HV; DDD Study. Making new genetic diagnoses with old data: iterative reanalysis and reporting from genome-wide data in 1,133 families with developmental disorders. *Genet Med.* 2018;20(10):1216-23.

124 Liu P, Meng L, Normand EA, Xia F, Song X, Ghazi A, Rosenfeld J, Magoulas PL, Braxton A, Ward P, Dai H, Yuan B, Bi W, Xiao R, Wang X, Chiang T, Vetrini F, He W, Cheng H, Dong J, Gijavanekar C, Benke PJ, Bernstein JA, Eble T, Eroglu Y, Erwin D, Escobar L, Gibson JB, Gripp K, Kleppe S, Koenig MK, Lewis AM, Natowicz M, Mancias P, Minor L, Scaglia F, Schaaf CP, Streff H, Vernon H, Uhles CL, Zackai EH, Wu N, Sutton VR, Beaudet AL, Muzny D, Gibbs RA, Posey JE, Lalani S, Shaw C, Eng CM, Lupski JR, Yang Y. Reanalysis of clinical exome sequencing data. *N Engl J Med.* 2019;380(25):2478-80.

125 Bennett JT, Vasta V, Zhang M, Narayanan J, Gerrits P, Hahn SH. Molecular genetic testing of patients with monogenic diabetes and hyperinsulinism. *Mol Genet Metab.* 2015;114(3):451-8.

- 126 Chèvre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanché H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E, Charpentier G, Beckers D, Maes M, Bellanné-Chantelot C, Velho G, Froguel P. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia*. 1998 Sep;41(9):1017-23.
- 127 Mohan V, Radha V, Nguyen TT, Stawiski EW, Pahuja KB, Goldstein LD, Tom J, Anjana RM, Kong-Beltran M, Bhangale T, Jahnavi S, Chandni R, Gayathri V, George P, Zhang N, Murugan S, Phalke S, Chaudhuri S, Gupta R, Zhang J, Santhosh S, Stinson J, Modrusan Z, Ramprasad VL, Seshagiri S, Peterson AS. Comprehensive genomic analysis identifies pathogenic variants in maturity-onset diabetes of the young (MODY) patients in South India. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):22.
- 128 Park SS, Jang SS, Ahn CH, Kim JH, Jung HS, Cho YM, Lee YA, Shin CH, Chae JH, Kim JH, Choi SH, Jang HC, Bae JC, Won JC, Kim SH, Kim JI, Kwak SH, Park KS. Identifying pathogenic variants of monogenic diabetes using targeted panel sequencing in an east asian population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(9):4188-98.
- 129 Breidbart E, Deng L, Lanzano P, Fan X, Guo J, Leibel RL, LeDuc CA, Chung WK. Frequency and characterization of mutations in genes in a large cohort of patients referred to MODY registry. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2021;34(5):633-8.
- 130 Vaxillaire M, Bonnefond A, Liatis S, Ben Salem Hachmi L, Jotic A, Boissel M, Gaget S, Durand E, Vaillant E, Derhourhi M, Canouil M, Larcher N, Allegaert F, Medlej R, Chadli A, Belhadj A, Chaieb M, Raposo JF, Ilkova H, Loizou D, Lalic N, Vassallo J, Marre M, Froguel P; MODY-MGSD Study Group. Monogenic diabetes characteristics in a transnational multicenter study from Mediterranean countries. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021;171:108553.
- 131 Shepherd MH, Shields BM, Hudson M, Pearson ER, Hyde C, Ellard S, Hattersley AT, Patel KA; UNITED study. A UK nationwide prospective study of treatment change in MODY: genetic subtype and clinical characteristics predict optimal glycaemic control after discontinuing insulin and metformin. *Diabetologia*. 2018;61(12):2520-7.
- 132 Lemelman MB, Letourneau L, Greeley SAW. Neonatal diabetes mellitus: an update on diagnosis and management. *Clin Perinatol*. 2018;45(1):41-59.

- 133 Santana LS de. Análise genético-molecular integrada aplicada ao processo de investigação de pacientes com diagnóstico clínico de MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young). [Dissertação Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.
- 134 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 Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.
- 135 Riquetto ADC. Análise genético-molecular por sequenciamento paralelo em larga escala de portadores das formas raras de diabetes monogênico e lipodistrofias hereditárias [Dissertação Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.
- 136 Campos Franco P, Santos de Santana L, Dantas Costa-Riquetto A, Santomauro Junior AC, Jorge AAL, Gurgel Teles M. Clinical and genetic characterization and long-term evaluation of individuals with maturity-onset diabetes of the young (MODY): The journey towards appropriate treatment. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;187:109875.
- 137 Mosbah H, Donadille B, Vatier C, Janmaat S, Atlan M, Badens C, Barat P, Béliard S, Beltrand J, Ben Yaou R, Bismuth E, Boccara F, Cariou B, Chaouat M, Charriot G, Christin-Maitre S, De Kerdanet M, Delemer B, Disse E, Dubois N, Eymard B, Fève B, Lascols O, Mathurin P, Nobécourt E, Poujol-Robert A, Prevost G, Richard P, Sellam J, Tauveron I, Treboz D, Vergès B, Vermot-Desroches V, Wahbi K, Jéru I, Vantyghem MC, Vigouroux C. Dunnigan lipodystrophy syndrome: French National Diagnosis and Care Protocol (PNDS; Protocole National de Diagnostic et de Soins). *Orphanet J Rare Dis.* 2022;17(Suppl 1):170.
- 138 Vasandani C, Li X, Sekizkardes H, Adams-Huet B, Brown RJ, Garg A. Diagnostic value of anthropometric measurements for familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(7):2132-41.
- 139 Riquetto ADC. Análise genético-molecular por sequenciamento paralelo em larga escala de portadores das formas raras de diabetes monogênico e lipodistrofias hereditárias [Dissertação Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

- 140 Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D, Albert I, Taylor J, Miller W, Kent WJ, Nekrutenko A. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res.* 2005 Oct;15(10):1451-5.
- 141 Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, Nekrutenko A, Taylor J. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol.* 2010 Jan;Chapter 19:Unit 19.10.1-21.
- 142 Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J; Galaxy Team. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 2010;11(8):R86.
- 143 Blankenberg D, Gordon A, Von Kuster G, Coraor N, Taylor J, Nekrutenko A; Galaxy Team. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics.* 2010 Jul 15;26(14):1783-5.
- 144 Andrew S. FastQC A quality control tool for high throughput sequence data. 2016. Available at 2016. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- 145 Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-60.
- 146 Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *ArXiv 1207.* 2012.
- 147 Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164.
- 148 Li J, Lupat R, Amarasinghe KC, Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, Tothill RW, Halgamuge SK, Campbell IG, Gorringer KL. CONTRA: copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics.* 2012;28(10):1307-13.
- 149 Goudenège D, Bris C, Hoffmann V, Desquirit-Dumas V, Jardel C, Rucheton B, Bannwarth S, Paquis-Flucklinger V, Lebre AS, Colin E, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G, Procaccio V. eKLIPse: a sensitive tool for the detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequencing data. *Genet Med.* 2019;21(6):1407-16.

- 150 Greeley SAW, Polak M, Njølstad PR, Barbetti F, Williams R, Castano L, Raile K, Chi DV, Habeb A, Hattersley AT, Codner E. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2022;23(8):1188-211.
- 151 Zhang H, Maloney KA, Barbetti F, Greeley SAW, Kettunen J, Miranda JP, Molnes J, Murphy R, Rochelle Naylor RN, Pakyz RE, Philipson LH, Prudente S, Tuomi T, Udler M, Colclough K, Jeng L, Pollin TI. Adaption of the ACMG/AMP Variant Interpretation Guidelines for GCK, HNF1A, HNF4A-MODY: Recommendations from the ClinGen Monogenic Diabetes Expert Panel (MDEP) for Variant Curation. *Diabetes*. 2020;69(Supplement 1):1453.
- 152 McCormick EM, Lott MT, Dulik MC, Shen L, Attimonelli M, Vitale O, Karaa A, Bai R, Pineda-Alvarez DE, Singh LN, Stanley CM, Wong S, Bhardwaj A, Merkurjev D, Mao R, Sondheimer N, Zhang S, Procaccio V, Wallace DC, Gai X, Falk MJ. Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation. *Hum Mutat*. 2020;41(12):2028-57.
- 153 Colclough K, van Heugten R, Patel K. An update on the diagnosis and management of monogenic diabetes. *Pract Diabetes*. 2022;39(4):42-8.
- 154 Laver TW, Wakeling MN, Knox O, Colclough K, Wright CF, Ellard S, Hattersley AT, Weedon MN, Patel KA. Evaluation of evidence for pathogenicity demonstrates that BLK, KLF11, and PAX4 should not be included in diagnostic testing for MODY. *Diabetes*. 2022;71(5):1128-36.
- 155 Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG; Exome Aggregation Consortium.

Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-91.

156 Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, Bozoklian D, Sandberg TOM, Brito LA, Lazar M, Bernardo DV, Amaro E Jr, Duarte YAO, Lebrão ML, Passos-Bueno MR, Zatz M. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat*. 2017;38(7):751-63.

157 Najmi LA, Aukrust I, Flannick J, Molnes J, Burt N, Molven A, Groop L, Altshuler D, Johansson S, Bjørkhaug L, Njølstad PR. Functional investigations of HNF1A identify rare variants as risk factors for type 2 diabetes in the general population. *Diabetes*. 2017;66(2):335-46.

158 Karzon R, Narayanan A, Chen L, Lieu JEC, Hershey T. Longitudinal hearing loss in Wolfram syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):102.

159 Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet*. 1995;346(8988):1458-63.

160 Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Stanford JL, Isaacs WB, Xu J, Cooney KA, Lange EM, Schleutker J, Carpten JD, Powell IJ, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Giles GG, MacInnis RJ, Maier C, Hsieh CL, Wiklund F, Catalona WJ, Foulkes WD, Mandal D, Eeles RA, Kote-Jarai Z, Bustamante CD, Schaid DJ, Hastie T, Ostrander EA, Bailey-Wilson JE, Radivojac P, Thibodeau SN, Whittemore AS, Sieh W. REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am J Hum Genet*. 2016;99(4):877-85.

161 Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, Kosmicki JA, Arbelaez J, Cui W, Schwartz GB, Chow ED, Kanterakis E, Gao H, Kia A, Batzoglou S, Sanders SJ, Farh KK. Predicting splicing from primary sequence with deep learning. *Cell*. 2019;176(3):535-48.e24.

162 Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, Raca G, Ritter DI, South ST, Thorland EC, Pineda-Alvarez D, Aradhya S, Martin CL. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical

Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2020;22(2):245-57.

163 Brandon MC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Procaccio V, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Patil U, Baldi P, Wallace DC. MITOMASTER: a bioinformatics tool for the analysis of mitochondrial DNA sequences. *Hum Mutat.* 2009;30(1):1-6.

164 Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D611-3.

165 Sonney S, Leipzig J, Lott MT, Zhang S, Procaccio V, Wallace DC, Sondheimer N. Predicting the pathogenicity of novel variants in mitochondrial tRNA with MitoTIP. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(12):e1005867.

166 Castellana S, Fusilli C, Mazzoccoli G, Biagini T, Capocéfalo D, Carella M, Vescovi AL, Mazza T. High-confidence assessment of functional impact of human mitochondrial non-synonymous genome variations by APOGEE. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(6):e1005628.

167 Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.

168 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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):405-24.

169 Hegele RA, Cao H, Liu DM, Costain GA, Charlton-Menys V, Rodger NW, Durrington PN. Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet.* 2006;79(2):383-9.

170 Meral R, Ryan BJ, Malandrino N, Jalal A, Neidert AH, Muniyappa R, Akinci B, Horowitz JF, Brown RJ, Oral EA. "Fat Shadows" from DXA for the qualitative assessment of lipodystrophy: when a picture is worth a thousand numbers. *Diabetes Care.* 2018;41(10):2255-8.

- 171 Santana LS. Estudo do exoma em famílias com diagnóstico clínico de MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) e diabetes mellitus neonatal [tese Doutorado - Endocrinologia]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.
- 172 Tan NB, Stapleton R, Stark Z, Delatycki MB, Yeung A, Hunter MF, Amor DJ, Brown NJ, Stutterd CA, McGillivray G, Yap P, Regan M, Chong B, Fanjul Fernandez M, Marum J, Phelan D, Pais LS, White SM, Lunke S, Tan TY. Evaluating systematic reanalysis of clinical genomic data in rare disease from single center experience and literature review. *Mol Genet Genomic Med.* 2020;8(11):e1508.
- 173 Hu FB. Calorie restriction in an obesogenic environment: reality or fiction? *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(9):658-659.
- 174 Giskes K, van Lenthe F, Avendano-Pabon M, Brug J. A systematic review of environmental factors and obesogenic dietary intakes among adults: are we getting closer to understanding obesogenic environments? *Obes Rev.* 2011;12(5):e95-e106.
- 175 Jia P. Obesogenic environment and childhood obesity. *Obes Rev.* 2021;22 Suppl 1:e13158.
- 176 Delude CM. Deep phenotyping: The details of disease. *Nature.* 2015;527:S14-S15.
- 177 Han TS, Feskens EJ, Lean ME, Seidell JC. Associations of body composition with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1998;15(2):129-35.
- 178 Vassy JL, Hivert MF, Porneala B, Dauriz M, Florez JC, Dupuis J, Siscovick DS, Fornage M, Rasmussen-Torvik LJ, Bouchard C, Meigs JB. Polygenic type 2 diabetes prediction at the limit of common variant detection. *Diabetes.* 2014;63(6):2172-82.
- 179 Sacks DB. A1C versus glucose testing: a comparison. *Diabetes Care.* 2011;34(2):518-23.
- 180 Cobas R, Rodacki M, Giacaglia L, Calliari LEP, Noronha RM, Valerio C, Custódio J, Scharf M, Barcellos CRG, Tomarchio MP, da Silva MER, dos Santos RF, Zajdenverg L, Gabbay M. Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2.

In: Bertoluci M (editor chefe). Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas; 2022.

181 Schafer S, Miao K, Benson CC, Heinig M, Cook SA, Hubner N. Alternative Splicing Signatures in RNA-seq Data: Percent Spliced in (PSI). *Curr Protoc Hum Genet.* 2015;87:11.16.1-11.16.14.

182 Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today.* 2008;13(17-18):760-70.

183 Korakas E, Argyropoulos T, Koliou GA, Gikas A, Kountouri A, Nikolopoulou SK, Plotas P, Kontoangelos K, Ikonomidis I, Kadoglou NPE, Raptis A, Lambadiari V. Prevalence and prognostic factors of stress hyperglycemia in a pediatric population with acute illness in Greece-A prospective observational study. *J Clin Med.* 2022;11(5):1301.

184 Gupta P, Natarajan G, Agarwal KN. Transient hyperglycemia in acute childhood illnesses: to attend or ignore? *Indian J Pediatr.* 1997;64(2):205-10.

185 Tatsumi Y, Ohno Y, Morimoto A, Nishigaki Y, Maejima F, Mizuno S, Watanabe S. U-shaped relationship between body mass index and incidence of diabetes. *Diabetol Int.* 2012;3(2):92-8.

186 Bombard Y, Brothers KB, Fitzgerald-Butt S, Garrison NA, Jamal L, James CA, Jarvik GP, McCormick JB, Nelson TN, Ormond KE, Rehm HL, Richer J, Souzeau E, Vassy JL, Wagner JK, Levy HP. The responsibility to recontact research participants after reinterpretation of genetic and genomic research results. *Am J Hum Genet.* 2019;104(4):578-95.

187 De Franco E. From biology to genes and back again: gene discovery for monogenic forms of beta-cell dysfunction in diabetes. *J Mol Biol.* 2020;432(5):1535-50.

188 Sheffield NC, Furey TS. Identifying and characterizing regulatory sequences in the human genome with chromatin accessibility assays. *Genes (Basel).* 2012;3(4):651-70.

- 189 Lascar N, Brown J, Pattison H, Barnett AH, Bailey CJ, Bellary S. Type 2 diabetes in adolescents and young adults. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(1):69-80.
- 190 Bonnefond A, Unnikrishnan R, Doria A, Vaxillaire M, Kulkarni RN, Mohan V, Trischitta V, Froguel P. Monogenic diabetes. *Nat Rev Dis Primers.* 2023;9(1):12.
- 191 Demirbilek H, Cayir A, Flanagan SE, Yıldırım R, Kor Y, Gurbuz F, Haliloğlu B, Yıldız M, Baran RT, Akbas ED, Demiral M, Ünal E, Arslan G, Vuralli D, Buyukyilmaz G, Al-Khawaga S, Saeed A, Al Maadheed M, Khalifa A, Onal H, Yuksel B, Ozbek MN, Bereket A, Hattersley AT, Hussain K, De Franco E. Clinical characteristics and long-term follow-up of patients with diabetes due to PTF1A enhancer mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(12):e4351-9.
- 192 Iafusco D, Stazi MA, Cotichini R, Cotellessa M, Martinucci ME, Mazzella M, Cherubini V, Barbetti F, Martinetti M, Cerutti F, Prisco F; Early Onset Diabetes Study Group of the Italian Society of Paediatric Endocrinology and Diabetology. Permanent diabetes mellitus in the first year of life. *Diabetologia.* 2002;45(6):798-804.
- 193 Massa O, Iafusco D, D'Amato E, Gloyn AL, Hattersley AT, Pasquino B, Tonini G, Dammacco F, Zanette G, Meschi F, Porzio O, Bottazzo G, Crinó A, Lorini R, Cerutti F, Vanelli M, Barbetti F; Early Onset Diabetes Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. *Hum Mutat.* 2005;25(1):22-7.
- 194 Rubio-Cabezas O, Flanagan SE, Damhuis A, Hattersley AT, Ellard S. KATP channel mutations in infants with permanent diabetes diagnosed after 6 months of life. *Pediatr Diabetes.* 2012;13(4):322-5.
- 195 O'Rawe JA, Ferson S, Lyon GJ. Accounting for uncertainty in DNA sequencing data. *Trends Genet.* 2015;31(2):61-6.
- 196 Robasky K, Lewis NE, Church GM. The role of replicates for error mitigation in next-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2014;15(1):56-62.
- 197 Ratan A, Miller W, Guillory J, Stinson J, Seshagiri S, Schuster SC. Comparison of sequencing platforms for single nucleotide variant calls in a human sample. *PLoS One.* 2013;8(2):e55089.

- 198 Peters BA, Kermani BG, Sparks AB, Alferov O, Hong P, Alexeev A, Jiang Y, Dahl F, Tang YT, Haas J, Robasky K, Zaranek AW, Lee JH, Ball MP, Peterson JE, Perazich H, Yeung G, Liu J, Chen L, Kennemer MI, Pothuraju K, Konvicka K, Tsoupko-Sitnikov M, Pant KP, Ebert JC, Nilsen GB, Baccash J, Halpern AL, Church GM, Drmanac R. Accurate whole-genome sequencing and haplotyping from 10 to 20 human cells. *Nature*. 2012;487(7406):190-5.
- 199 Soejima A, Inoue K, Takai D, Kaneko M, Ishihara H, Oka Y, Hayashi JI. Mitochondrial DNA is required for regulation of glucose-stimulated insulin secretion in a mouse pancreatic beta cell line, MIN6. *J Biol Chem*. 1996 Oct 18;271(42):26194-9.
- 200 Zammouri J, Vatier C, Capel E, Auclair M, Storey-London C, Bismuth E, Mosbah H, Donadille B, Janmaat S, Fève B, Jéru I, Vigouroux C. Molecular and cellular bases of lipodystrophy syndromes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;12:803189.
- 201 Patni N, Garg A. Lipodystrophy for the diabetologist-what to look for. *Curr Diab Rep*. 2022;22(9):461-70.
- 202 Udler MS, Kim J, von Grotthuss M, Bonàs-Guarch S, Cole JB, Chiou J; Christopher D. Anderson on behalf of METASTROKE and the ISGC; Boehnke M, Laakso M, Atzmon G, Glaser B, Mercader JM, Gaulton K, Flannick J, Getz G, Florez JC. Type 2 diabetes genetic loci informed by multi-trait associations point to disease mechanisms and subtypes: A soft clustering analysis. *PLoS Med*. 2018;15(9):e1002654.
- 203 Srinivasan S, Jablonski KA, Knowler WC, Dagogo-Jack S, Kahn S, Boyko EJ, Bray GA, Horton ES, Hivert MF, Goldberg R, Chen L, Mercader J, Harden M, Florez JC; Diabetes Prevention Program Research Group. A polygenic lipodystrophy genetic risk score characterizes risk independent of BMI in the Diabetes Prevention Program. *J Endocr Soc*. 2019;3(9):1663-77.
- 204 Handelsman Y, Oral EA, Bloomgarden ZT, Brown RJ, Chan JL, Einhorn D, Garber AJ, Garg A, Garvey WT, Grunberger G, Henry RR, Lavin N, Tapiador CD, Weyer C; American Association of Clinical Endocrinologists. The clinical approach to the detection of lipodystrophy - an AACE consensus statement. *Endocr Pract*. 2013;19(1):107-16.

- 205 Garg A. Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):3313-25.
- 206 Murphy R, Turnbull DM, Walker M, Hattersley AT. Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet Med.* 2008;25(4):383-99.
- 207 Ng YS, Bindoff LA, Gorman GS, Klopstock T, Kornblum C, Mancuso M, McFarland R, Sue CM, Suomalainen A, Taylor RW, Thorburn DR, Turnbull DM. Mitochondrial disease in adults: recent advances and future promise. *Lancet Neurol.* 2021;20(7):573-84.
- 208 Grady JP, Pickett SJ, Ng YS, Alston CL, Blakely EL, Hardy SA, Feeney CL, Bright AA, Schaefer AM, Gorman GS, McNally RJ, Taylor RW, Turnbull DM, McFarland R. mtDNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m.3243A>G mitochondrial disease. *EMBO Mol Med.* 2018;10(6):e8262.
- 209 Souza AM, Resende SS, Sousa TN, Brito CFA. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet Mol Biol.* 2019;42(3):495-508.
- 210 Moosajee M, Yu-Wai-Man P, Rouzier C, Bitner-Glindzicz M, Bowman R. Clinical utility gene card for: Wolfram syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2016 Nov;24(11).
- 211 Urano F. Wolfram syndrome: diagnosis, management, and treatment. *Curr Diab Rep.* 2016;16(1):6.
- 212 Delvecchio M, Iacoviello M, Pantaleo A, Resta N. Clinical spectrum associated with Wolfram syndrome type 1 and type 2: A review on genotype-phenotype correlations. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(9):4796.
- 213 de Muijnck C, Brink JBT, Bergen AA, Boon CJF, van Genderen MM. Delineating Wolfram-like syndrome: A systematic review and discussion of the WFS1-associated disease spectrum. *Surv Ophthalmol.* 2023;68(4):641-54.

- 214 Morikawa S, Tajima T, Nakamura A, Ishizu K, Ariga T. A novel heterozygous mutation of the *WFS1* gene leading to constitutive endoplasmic reticulum stress is the cause of Wolfram syndrome. *Pediatr Diabetes*. 2017;18(8):934-941.
- 215 De Franco E, Flanagan SE, Yagi T, Abreu D, Mahadevan J, Johnson MB, Jones G, Acosta F, Mulaudzi M, Lek N, Oh V, Petz O, Caswell R, Ellard S, Urano F, Hattersley AT. Dominant ER Stress-Inducing *WFS1* mutations underlie a genetic syndrome of neonatal/infancy-onset diabetes, congenital sensorineural deafness, and congenital cataracts. *Diabetes*. 2017;66(7):2044-53.
- 216 Tsiortou P, Alexopoulos H, Dalakas MC. GAD antibody-spectrum disorders: progress in clinical phenotypes, immunopathogenesis and therapeutic interventions. *Ther Adv Neurol Disord*. 2021;14:17562864211003486.
- 217 Sørgerd EP, Thorsby PM, Torjesen PA, Skorpen F, Kvaløy K, Grill V. Presence of anti-GAD in a non-diabetic population of adults; time dynamics and clinical influence: results from the HUNT study. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2015;3(1):e000076.
- 218 Till AM, Kenk H, Rjasanowski I, Wassmuth R, Walschus U, Kerner W, Schlosser M. Autoantibody-defined risk for Type 1 diabetes mellitus in a general population of schoolchildren: results of the Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study after 18 years. *Diabet Med*. 2015;32(8):1008-16.
- 219 Lundgren VM, Isomaa B, Lyssenko V, Laurila E, Korhonen P, Groop LC, Tuomi T; Botnia Study Group. GAD antibody positivity predicts type 2 diabetes in an adult population. *Diabetes*. 2010;59(2):416-22.
- 220 Kocaaga A, Yimenicioglu S, Bayav M. A p.Val412Serfs pathogenic variant associated with Wolfram-like syndrome and leukodystrophy. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg*. 2023;59(1):1-6.
- 221 d'Annunzio G, Minuto N, D'Amato E, de Toni T, Lombardo F, Pasquali L, Lorini R. Wolfram syndrome (diabetes insipidus, diabetes, optic atrophy, and deafness): clinical and genetic study. *Diabetes Care*. 2008;31(9):1743-5.

- 222 Aloï C, Salina A, Pasquali L, Lugani F, Perri K, Russo C, Tallone R, Ghiggeri GM, Lorini R, d'Annunzio G. Wolfram syndrome: new mutations, different phenotype. *PLoS One*. 2012;7(1):e29150.
- 223 Giuliano F, Bannwarth S, Monnot S, Cano A, Chabrol B, Vialettes B, Delobel B, Paquis-Flucklinger V; French Group of WS. Wolfram syndrome in French population: characterization of novel mutations and polymorphisms in the WFS1 gene. *Hum Mutat*. 2005;25(1):99-100.
- 224 Gasparin MR, Crispim F, Paula SL, Freire MB, Dalbosco IS, Manna TD, Salles JE, Gasparin F, Guedes A, Marcantonio JM, Gambini M, Salim CP, Moisés RS. Identification of novel mutations of the WFS1 gene in Brazilian patients with Wolfram syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2009;160(2):309-16.
- 225 Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*. 2002;32(1):128-34.
- 226 Sellick GS, Barker KT, Stolte-Dijkstra I, Fleischmann C, Coleman RJ, Garrett C, Gloyn AL, Edghill EL, Hattersley AT, Wellauer PK, Goodwin G, Houlston RS. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat Genet*. 2004;36(12):1301-5.
- 227 Tian JM, Schibler U. Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev*. 1991;5(12A):2225-34.
- 228 Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*. 1990;61(6):931-7.
- 229 Chomyn A, Meola G, Bresolin N, Lai ST, Scarlato G, Attardi G. In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol Cell Biol*. 1991;11(4):2236-44.
- 230 Suzuki S, Hinokio Y, Hirai S, Onoda M, Matsumoto M, Ohtomo M, Kawasaki H, Satoh Y, Akai H, Abe K, et al. Diabetes with mitochondrial gene tRNALYS mutation. *Diabetes Care*. 1994;17(12):1428-32.

- 231 Berkovic SF, Shoubbridge EA, Andermann F, Andermann E, Carpenter S, Karpati G. Clinical spectrum of mitochondrial DNA mutation at base pair 8344. *Lancet*. 1991;338(8764):457.
- 232 Austin SA, Vriesendorp FJ, Thandroyen FT, Hecht JT, Jones OT, Johns DR. Expanding the phenotype of the 8344 transfer RNA lysine mitochondrial DNA mutation. *Neurology*. 1998;51(5):1447-50.
- 233 Molnar MJ, Perenyi J, Siska E, Nemeth G, Nagy Z. The typical MERRF (A8344G) mutation of the mitochondrial DNA associated with depressive mood disorders. *J Neurol*. 2009;256(2):264-5.
- 234 Wahbi K, Larue S, Jardel C, Meune C, Stojkovic T, Ziegler F, Lombès A, Eymard B, Duboc D, Laforêt P. Cardiac involvement is frequent in patients with the m.8344A>G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology*. 2010;74(8):674-7.
- 235 Altmann J, Büchner B, Nadaj-Pakleza A, Schäfer J, Jackson S, Lehmann D, Deschauer M, Kopajtich R, Lautenschläger R, Kuhn KA, Karle K, Schöls L, Schulz JB, Weis J, Prokisch H, Kornblum C, Claeys KG, Klopstock T. Expanded phenotypic spectrum of the m.8344A>G "MERRF" mutation: data from the German mitoNET registry. *J Neurol*. 2016;263(5):961-72.
- 236 Chen RS, Huang CC, Lee CC, Wai YY, Hsi MS, Pang CY, Wei YH. Overlapping syndrome of MERRF and MELAS: molecular and neuroradiological studies. *Acta Neurol Scand*. 1993;87(6):494-8.
- 237 Kobayashi M, Nezu Y, Tagawa R, Higami Y. Mitochondrial unfolded protein responses in white adipose tissue: lipotrophy, whole-body metabolism and lifespan. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):2854.
- 238 Ruegsegger GN, Creo AL, Cortes TM, Dasari S, Nair KS. Altered mitochondrial function in insulin-deficient and insulin-resistant states. *J Clin Invest*. 2018;128(9):3671-81.
- 239 Galizzi G, Palumbo L, Amato A, Conigliaro A, Nuzzo D, Terzo S, Caruana L, Picone P, Alessandro R, Mulè F, Di Carlo M. Altered insulin pathway compromises mitochondrial function and quality control both in in vitro and in vivo model systems. *Mitochondrion*. 2021;60:178-88.

- 240 Sleigh A, Raymond-Barker P, Thackray K, Porter D, Hatunic M, Vottero A, Burren C, Mitchell C, McIntyre M, Brage S, Carpenter TA, Murgatroyd PR, Brindle KM, Kemp GJ, O'Rahilly S, Semple RK, Savage DB. Mitochondrial dysfunction in patients with primary congenital insulin resistance. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2457-61.
- 241 Sato M, Tamura Y, Nakagata T, Someya Y, Kaga H, Yamasaki N, Kiya M, Kadowaki S, Sugimoto D, Satoh H, Kawamori R, Watada H. Prevalence and features of impaired glucose tolerance in young underweight Japanese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(5):e2053-e2062.
- 242 Misra M, Klibanski A. Endocrine consequences of anorexia nervosa. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(7):581-92.
- 243 Chen M, Liang H, Zhou W, Li C, Weng J. A novel heterozygous deletion in the intron 8-exon 9 boundary of the glucokinase gene in a Chinese pedigree of GCK-MODY. *Acta Diabetol*. 2017;54(8):799-802.
- 244 Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD, Araujo LR, Calliari LEP, Rodacki M, Bezerra MGT, Gabbay MAL, Montenegro Junior, RM. (eds.). Posicionamento Oficial SBD número 06/2019: Abordagem da Pessoa Jovem com Diabetes 2019/2020.
- 245 Smith SB, Qu HQ, Taleb N, Kishimoto NY, Scheel DW, Lu Y, Patch AM, Grabs R, Wang J, Lynn FC, Miyatsuka T, Mitchell J, Seerke R, Désir J, Vanden Eijnden S, Abramowicz M, Kacet N, Weill J, Renard ME, Gentile M, Hansen I, Dewar K, Hattersley AT, Wang R, Wilson ME, Johnson JD, Polychronakos C, German MS. Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature*. 2010;463(7282):775-80.
- 246 Sansbury FH, Kirel B, Caswell R, Allen HL, Flanagan SE, Hattersley AT, Ellard S, Shaw-Smith CJ. Biallelic RFX6 mutations can cause childhood as well as neonatal onset diabetes mellitus. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(12):1744-8.
- 247 Imaki S, Iizuka K, Horikawa Y, Yasuda M, Kubota S, Kato T, Liu Y, Takao K, Mizuno M, Hirota T, Suwa T, Hosomichi K, Tajima A, Fujiwara Y, Yamazaki Y, Kuwata H, Seino Y, Yabe D. A novel RFX6 heterozygous mutation (p.R652X) in maturity-onset diabetes mellitus: A case report. *J Diabetes Investig*. 2021;12(10):1914-8.

- 248 Kim GL, Kwak SH, Yu J. A case of monogenic diabetes mellitus caused by a novel heterozygous *RFX6* nonsense mutation in a 14-year-old girl. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2021;34(12):1619-22.
- 249 Patel KA, Oram RA, Flanagan SE, De Franco E, Colclough K, Shepherd M, Ellard S, Weedon MN, Hattersley AT. Type 1 Diabetes Genetic Risk Score: A Novel Tool to Discriminate Monogenic and Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2016;65(7):2094-9.
- 250 Stride A, Vaxillaire M, Tuomi T, Barbetti F, Njølstad PR, Hansen T, Costa A, Conget I, Pedersen O, Søvik O, Lorini R, Groop L, Froguel P, Hattersley AT. The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia.* 2002;45(3):427-35.
- 251 Lebovitz HE, Banerji MA. Ketosis-prone diabetes (Flatbush Diabetes): an emerging worldwide clinically important entity. *Curr Diab Rep.* 2018;18(11):120.
- 252 de Heredia ML, Clèries R, Nunes V. Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genet Med.* 2013;15(7):497-506.
- 253 Fischer TT, Ehrlich BE. Wolfram Syndrome: a monogenic model to study diabetes mellitus and neurodegeneration. *Curr Opin Physiol.* 2020;17:115-23.
- 254 Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G, McCulloch LJ, Ferreira T, Grallert H, Amin N, Wu G, Willer CJ, Raychaudhuri S, McCarroll SA, Langenberg C, Hofmann OM, Dupuis J, Qi L, Segrè AV, van Hoek M, Navarro P, Ardlie K, Balkau B, Benediktsson R, Bennett AJ, Blagieva R, Boerwinkle E, Bonnycastle LL, Bengtsson Boström K, Bravenboer B, Bumpstead S, Burt NP, Charpentier G, Chines PS, Cornelis M, Couper DJ, Crawford G, Doney AS, Elliott KS, Elliott AL, Erdos MR, Fox CS, Franklin CS, Ganser M, Gieger C, Grarup N, Green T, Griffin S, Groves CJ, Guiducci C, Hadjadj S, Hassanali N, Herder C, Isomaa B, Jackson AU, Johnson PR, Jørgensen T, Kao WH, Klopp N, Kong A, Kraft P, Kuusisto J, Lauritzen T, Li M, Lieveise A, Lindgren CM, Lyssenko V, Marre M, Meitinger T, Midthjell K, Morken MA, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Payne F, Perry JR, Petersen AK, Platou C, Proença C, Prokopenko I, Rathmann W, Rayner NW, Robertson NR, Rocheleau G, Roden M, Sampson MJ, Saxena R, Shields BM, Shrader P, Sigurdsson G, Sparsø T, Strassburger K, Stringham HM, Sun Q, Swift AJ, Thorand B, Tichet J, Tuomi T, van

Dam RM, van Haefen TW, van Herpt T, van Vliet-Ostaptchouk JV, Walters GB, Weedon MN, Wijmenga C, Witteman J, Bergman RN, Cauchi S, Collins FS, Gloyn AL, Gyllenstein U, Hansen T, Hide WA, Hitman GA, Hofman A, Hunter DJ, Hveem K, Laakso M, Mohlke KL, Morris AD, Palmer CN, Pramstaller PP, Rudan I, Sijbrands E, Stein LD, Tuomilehto J, Uitterlinden A, Walker M, Wareham NJ, Watanabe RM, Abecasis GR, Boehm BO, Campbell H, Daly MJ, Hattersley AT, Hu FB, Meigs JB, Pankow JS, Pedersen O, Wichmann HE, Barroso I, Florez JC, Frayling TM, Groop L, Sladek R, Thorsteinsdottir U, Wilson JF, Illig T, Froguel P, van Duijn CM, Stefansson K, Altshuler D, Boehnke M, McCarthy MI; MAGIC investigators; GIANT Consortium. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010;42(7):579-89.

255 Anjana RM, Shanthi Rani CS, Deepa M, Pradeepa R, Sudha V, Divya Nair H, Lakshmi Priya N, Subhashini S, Binu VS, Unnikrishnan R, Mohan V. Incidence of diabetes and prediabetes and predictors of progression among Asian Indians: 10-year follow-up of the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES). *Diabetes Care.* 2015;38(8):1441-8.

256 Johansson BB, Fjeld K, El Jellas K, Gravdal A, Dalva M, Tjora E, Ræder H, Kulkarni RN, Johansson S, Njølstad PR, Molven A. The role of the carboxyl ester lipase (CEL) gene in pancreatic disease. *Pancreatology.* 2018;18(1):12-9.

257 DiPersio LP, Carter CP, Hui DY. Exon 11 of the rat cholesterol esterase gene encodes domains important for intracellular processing and bile salt-modulated activity of the protein. *Biochemistry.* 1994;33(11):3442-8

258 Bruneau N, Bendayan M, Gingras D, Ghitescu L, Levy E, Lombardo D. Circulating bile salt-dependent lipase originates from the pancreas via intestinal transcytosis. *Gastroenterology.* 2003;124(2):470-80.

259 Caillol N, Pasqualini E, Mas E, Valette A, Verine A, Lombardo D. Pancreatic bile salt-dependent lipase activity in serum of normolipidemic patients. *Lipids.* 1997;32(11):1147-53.

260 Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, Nerøen I, Eide SA, Grevle L, Bjørkhaug L, Sagen JV, Aksnes L, Sjøvik O, Lombardo D, Molven A, Njølstad PR. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet.* 2006;38(1):54-62.

- 261 Torsvik J, Johansson S, Johansen A, Ek J, Minton J, Raeder H, Ellard S, Hattersley A, Pedersen O, Hansen T, Molven A, Njølstad PR. Mutations in the VNTR of the carboxyl-ester lipase gene (CEL) are a rare cause of monogenic diabetes. *Hum Genet.* 2010;127(1):55-64.
- 262 Torsvik J, Johansson BB, Dalva M, Marie M, Fjeld K, Johansson S, Bjørkøy G, Saraste J, Njølstad PR, Molven A. Endocytosis of secreted carboxyl ester lipase in a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *J Biol Chem.* 2014;289(42):29097-111.
- 263 Johansson BB, Torsvik J, Bjørkhaug L, Vesterhus M, Ragvin A, Tjora E, Fjeld K, Hoem D, Johansson S, Ræder H, Lindquist S, Hernell O, Cnop M, Saraste J, Flatmark T, Molven A, Njølstad PR. Diabetes and pancreatic exocrine dysfunction due to mutations in the carboxyl ester lipase gene-maturity onset diabetes of the young (CEL-MODY): a protein misfolding disease. *J Biol Chem.* 2011;286(40):34593-605.
- 264 Xiao X, Jones G, Sevilla WA, Stolz DB, Magee KE, Haughney M, Mukherjee A, Wang Y, Lowe ME. A carboxyl ester lipase (CEL) mutant causes chronic pancreatitis by forming intracellular aggregates that activate apoptosis. *J Biol Chem.* 2017;292(19):7744,
- 265 El Jellas K, Dušátková P, Haldorsen IS, Molnes J, Tjora E, Johansson BB, Fjeld K, Johansson S, Průhová Š, Groop L, Löhr JM, Njølstad PR, Molven A. Two New Mutations in the CEL Gene Causing Diabetes and Hereditary Pancreatitis: How to Correctly Identify MODY8 Cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(4):e1455-e1466.
- 266 Hui DY, Howles PN. Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2002;43(12):2017-30.
- 267 Kodvawala A, Ghering AB, Davidson WS, Hui DY. Carboxyl ester lipase expression in macrophages increases cholesteryl ester accumulation and promotes atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2005;280(46):38592-8.
- 268 Augé N, Rebaï O, Lepetit-Thévenin J, Bruneau N, Thiers JC, Mas E, Lombardo D, Negre-Salvayre A, Vérine A. Pancreatic bile salt-dependent lipase induces smooth muscle cells proliferation. *Circulation.* 2003;108(1):86-91.

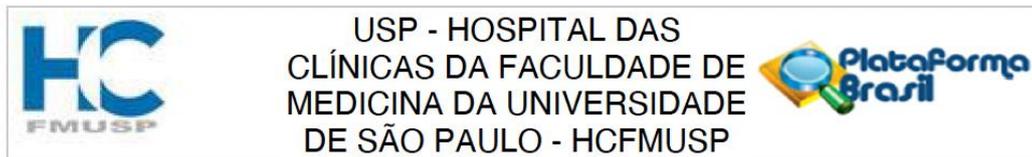
- 269 Bengtsson-Ellmark SH, Nilsson J, Orho-Melander M, Dahlenborg K, Groop L, Bjursell G. Association between a polymorphism in the carboxyl ester lipase gene and serum cholesterol profile. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(8):627-32.
- 270 Taylor R, Al-Mrabeh A, Zhyzhneuskaya S, Peters C, Barnes AC, Aribisala BS, Hollingsworth KG, Mathers JC, Sattar N, Lean MEJ. Remission of human type 2 diabetes requires decrease in liver and pancreas fat content but is dependent upon capacity for β cell recovery. *Cell Metab.* 2018;28(4):547-56.e3.
- 271 Taylor R, Al-Mrabeh A, Sattar N. Understanding the mechanisms of reversal of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(9):726-36.
- 272 Suzuki E, Evans T, Lowry J, Truong L, Bell DW, Testa JR, Walsh K. The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics.* 1996;38(3):283-90.
- 273 Allen HL, Flanagan SE, Shaw-Smith C, De Franco E, Akerman I, Caswell R; International Pancreatic Agenesis Consortium; Ferrer J, Hattersley AT, Ellard S. GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet.* 2011;44(1):20-2.
- 274 Zhang H, Colclough K, Gloyn AL, Pollin TI. Monogenic diabetes: a gateway to precision medicine in diabetes. *J Clin Invest.* 2021;131(3):e142244.
- 275 De Franco E, Shaw-Smith C, Flanagan SE, Shepherd MH; International NDM Consortium; Hattersley AT, Ellard S. GATA6 mutations cause a broad phenotypic spectrum of diabetes from pancreatic agenesis to adult-onset diabetes without exocrine insufficiency. *Diabetes.* 2013;62(3):993-7.
- 276 Xiang J, Yang J, Chen L, Chen Q, Yang H, Sun C, Zhou Q, Peng Z. Reinterpretation of common pathogenic variants in ClinVar revealed a high proportion of downgrades. *Sci Rep.* 2020;10(1):331.
- 277 Mattie S, Riemer J, Wideman JG, McBride HM. A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. *J Cell Biol.* 2018;217(2):507-15.

- 278 Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 2004;36(5):449-51.
- 279 Rocha N, Bulger DA, Frontini A, Titheradge H, Gribsholt SB, Knox R, Page M, Harris J, Payne F, Adams C, Sleigh A, Crawford J, Gjesing AP, Bork-Jensen J, Pedersen O, Barroso I, Hansen T, Cox H, Reilly M, Rossor A, Brown RJ, Taylor SI, McHale D, Armstrong M, Oral EA, Saudek V, O'Rahilly S, Maher ER, Richelsen B, Savage DB, Semple RK. Human biallelic MFN2 mutations induce mitochondrial dysfunction, upper body adipose hyperplasia, and suppression of leptin expression. *Elife.* 2017;6:e23813.
- 280 Capel E, Vazier C, Cervera P, Stojkovic T, Disse E, Cottureau AS, Auclair M, Verpont MC, Mosbah H, Gourdy P, Barraud S, Miquel A, Züchner S, Bonnefond A, Froguel P, Christin-Maitre S, Delemer B, Fève B, Laville M, Robert J, Tenenbaum F, Lascols O, Vigouroux C, Jéru I. MFN2-associated lipomatosis: Clinical spectrum and impact on adipose tissue. *J Clin Lipidol.* 2018;12(6):1420-35.
- 281 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
- 282 Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol.* 2012;30(5):434-9.

9 APÊNDICES

9 APÊNDICES

APÊNDICE A – Plataforma Brasil – Parecer Consubstanciado da Comissão de ética em pesquisa em seres humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico

Pesquisador: MILENA GURGEL TELES BEZERRA

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 01093912.8.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.636.529

Apresentação do Projeto:

O protocolo de pesquisa "REANÁLISE DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO PARALELO EM LARGA ESCALA EM BUSCA DE DEFEITOS GENÉTICOS RAROS EM UMA COORTE DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DIABETES MONOGÊNICO" é um projeto de doutorado e subprojeto do protocolo aprovado "Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico". O estudo não apresenta alterações no TCLE e nos riscos para o sujeito da pesquisa que foram previamente aprovados. Os pesquisadores vão investigar a ocorrência de mutações genéticas em indivíduos portadores de diabetes monogênico a fim de determinar a prevalência desse tipo de diabetes em brasileiros.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos do subprojeto estão bem descritos e estão relacionados com o estudo já aprovado.

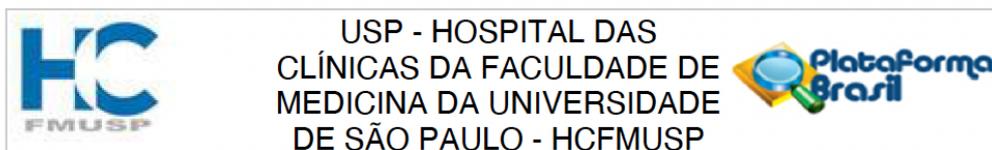
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Neste estudo não houve mudanças nos riscos e benefícios já abordados no projeto previamente aprovado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de grande relevância como apoio diagnóstico.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.636.529

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não haverá mudança no TCLE já apresentado no projeto aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

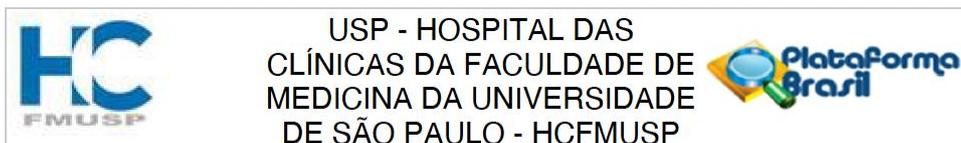
Recomendamos sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1707827_E5.pdf	24/02/2021 09:47:50		Aceito
Outros	Declaracao_de_Matricula_PedroCamposFranco_E6.pdf	24/02/2021 09:44:18	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_CAPPesq_PedroCamposFranco_E6.pdf	24/02/2021 09:41:00	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Outros	Projeto_PedroCamposFranco_E6.pdf	24/02/2021 09:40:19	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Outros	ProjetoDoutoradoLucas.pdf	26/03/2019 11:31:24	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Outros	CartaCAPPesqLucasDoutorado.pdf	26/03/2019 11:21:19	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Outros	CurriculoAlineDantas.docx	21/03/2017 16:15:40	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaCappesqAlineDantas.pdf	21/03/2017 16:14:51	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Outros	ProjetoAlineDantas.docx	21/03/2017 16:13:18	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Outros	ProjetoLucasSantana.pdf	08/04/2016 19:00:32	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaLucas.pdf	08/04/2016 18:57:59	MILENA GURGEL TELES BEZERRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_MODY_NGS_-_versao_FAPESP.pdf	30/09/2013 10:36:59		Aceito
Outros	Adendo Plataforma Brasil Lillian_back.JPG	30/09/2013 10:18:06		Aceito
Outros	Adendo Plataforma Brasil Lillian.JPG	30/09/2013 10:17:30		Aceito
Outros	Cappesq_Atualizado_29_05_2012.doc	29/05/2012 11:33:04		Aceito
Outros	Projeto_MODY_23_04_2012.pdf	23/04/2012 11:00:57		Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.636.529

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de consentimento livre e esclarecido_MODY_2012.doc	23/04/2012 10:51:48		Aceito
Outros	CappesqHCFMUSP.PDF	23/04/2012 10:49:54		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto_MODY.PDF	23/04/2012 10:47:20		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Abril de 2021

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 1 de 3

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 | <input type="checkbox"/> |
| RISCO BAIXO | <input type="checkbox"/> | RISCO MAIOR | <input type="checkbox"/> |

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

Rubrica do Paciente

TCLE – versão 2

Rubrica do Investigador

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 ____ / ____ / ____

APÊNDICE C – Artigo original: Campos Franco P, Santos de Santana L, Dantas Costa-Riquetto A, Santomauro Junior AC, Jorge AAL, Gurgel Teles M. Clinical and genetic characterization and long-term evaluation of individuals with maturity-onset diabetes of the young (MODY): The journey towards appropriate treatment. Diabetes Res Clin Pract. 2022;187(April):109875. doi:10.1016/j.diabres.2022.109875

diabetesresearchandclinicalpractice 187 (2022) 109875



Contents lists available at ScienceDirect

Diabetes Research and Clinical Practice

journal homepage: www.journals.elsevier.com/diabetes-research-and-clinical-practice



Clinical and genetic characterization and long-term evaluation of individuals with maturity-onset diabetes of the young (MODY): The journey towards appropriate treatment

Pedro Campos Franco^a, Lucas Santos de Santana^a, Aline Dantas Costa-Riquetto^a, Augusto Cezar Santomauro Junior^a, Alexander A.L. Jorge^{b,c}, Milena Gurgel Teles^{a,*}

^a Grupo de Diabetes Monogênica (Monogenic Diabetes Group), Unidade de Endocrinologia Genética (LIM25), Unidade de Diabetes, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), 01246-903 São Paulo, SP, Brazil

^b Unidade de Endocrinologia Genética (LIM25), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil

^c Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), 01246-903 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Diabetes mellitus
GCK-MODY
HNF1A-MODY
Genetic testing

ABSTRACT

Aims: To describe the clinical and genetic characteristics and long-term follow-up of a cohort with maturity-onset diabetes of the young (MODY), and to evaluate how molecular diagnosis impacted on treatment.

Methods: A large observational, retrospective, cohort study included individuals referred to the University of São Paulo's Monogenic Diabetes Unit between 2011 and 2020. Comprehensive clinical and genetic evaluations were performed.

Results: Overall, 228 individuals (190 GCK-MODY and 38 HNF1A-MODY) were enrolled. Sixty-two different GCK gene mutations (5 novel) and 17 HNF1A gene mutations (2 novel) were found. Data were available on treatment status for 76 index individuals with GCK-MODY. Before molecular diagnosis, nutritional intervention alone was used in 41 cases (53.9%). After molecular diagnosis, this number increased to 72 (94.8%). Glycated haemoglobin (HbA_{1c}) remained stable over the 6-year follow-up period: 6.5% (47 mmol/mol) at the first and 6.3% (45 mmol/mol) at the final visit ($p = 0.056$). Prior to molecular diagnosis, 7/21 (33.3%) HNF1A-MODY individuals were using sulfonylurea compared to 17/21 (81%) after testing. After a median of 5 years on sulfonylurea, HbA_{1c} values improved from 7.5% (58 mmol/mol) to 6.5% (48 mmol/mol) ($p = 0.006$).

Conclusions: Molecular diagnosis resulted in appropriate adjustment of treatment in approximately 80% of participants with GCK-MODY or HNF1A-MODY.

1. Introduction

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a monogenic non-autoimmune type of diabetes mellitus with an autosomal dominant inheritance pattern and high penetrance that accounts for 1–2% of all cases of diabetes [1]. The most common subtypes of MODY in all countries [1–9], including Brazil [10,11], are the result of pathogenic variants in the glucokinase (GCK) and hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF1A) genes.

In GCK-MODY, affected individuals present with asymptomatic, mild, non-progressive fasting hyperglycaemia and slight post-prandial increments in glucose levels [12]. The prevalence of the chronic

complications of diabetes is low and the mild phenotype requires no pharmacological treatment [3,13,14]. Few cohort studies have evaluated the beneficial effects of genetic testing on clinical course. Nevertheless, genetic diagnosis is crucial in enabling both unnecessary pharmacological treatments and unwarranted routine screening for diabetes-related complications to be appropriately discontinued [1,15].

Heterozygous loss-of-function variants in HNF1A impair beta-cell development and insulin secretion, leading to progressive glucose intolerance and need for pharmacological treatment [16]. Individuals with HNF1A-MODY are characteristically sensitive to low-dose sulfonylurea, with this treatment being considered safe and associated with better glucose control [17–19]. Some cohort studies have assessed the

* Corresponding author at: Grupo de Diabetes Monogênica (Monogenic Diabetes Group), Unidade de Endocrinologia Genética (LIM25), Unidade de Diabetes, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 01246-903 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail addresses: alexj@usp.br (A.A.L. Jorge), dramilenateles@diabetesmonogenico.org (M. Gurgel Teles).

<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109875>

Received 23 December 2021; Received in revised form 9 March 2022; Accepted 12 April 2022

Available online 25 April 2022

0168-8227/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.