

Lucas Santos de Santana

Estudo do exoma em famílias com diagnóstico clínico de MODY (*maturity-onset diabetes of the young*) e diabetes *mellitus* neonatal

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

São Paulo

2021

Lucas Santos de Santana

Estudo do exoma em famílias com diagnóstico clínico de MODY (*maturity-onset diabetes of the young*) e diabetes *mellitus* neonatal

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

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Lucas Santos de
Estudo do exoma em famílias com diagnóstico clínico
de MODY (maturity-onset diabetes of the young) e
diabetes mellitus neonatal / Lucas Santos de
Santana. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientador: Milena Gurgel Teles Bezerra.

Descritores: 1.Sequenciamento completo de exoma
2.Genética médica 3.Medicina molecular
4.Endocrinologia 5.MODY 6.Diabetes mellitus 7.Recém-
nascido

USP/FM/DBD-359/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À Andreia e Juarez, por alicerçarem a construção de um sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e especialmente à Dra. Milena Gurgel Teles Bezerra, pela mentoria e amizade que permitiram não apenas o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, como também um imensurável crescimento pessoal e profissional.

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

Ao Professor Alexander Augusto de Lima Jorge, pelas oportunidades, amizade, conversas de grande inspiração e aprendizado.

Aos meus colegas do Grupo de Diabetes Monogênico, Lilian, Aline, Pedro 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 e dos inúmeros hospitais-escola, centros universitários, clínicas e consultórios médicos que contribuíram para a construção desta coorte de estudo.

Às Professoras Berenice Bilharinho de Mendonça e Ana Claudia Latrônico Xavier, pelas oportunidades, colaborações e suporte institucional sempre oferecidos.

À Secretária 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, em especial, à secretária Maria Aparecida (Cida) por toda a ajuda e disposição constantes.

À Universidade de São Paulo, instituição pública de excelência em ensino e pesquisa e casa de grandes acadêmicos e mentores que incansavelmente contribuem para a construção do conhecimento e formação de recursos humanos.

Aos meus pais e família, pela construção e manutenção das estruturas que permitiram minha caminhada e crescimento.

Ao meu grande amor, Frederico XIV, pelos conselhos, carinho, compreensão e apoio incondicional que tornaram a conclusão desta caminhada mais doce.

EPIGRAFE

*“Blackbird singing in the dead of night
Take these broken wings and learn to fly
All your life
You were only waiting for this moment to arise”
(Blackbird - Lennon-McCartney, The Beatles)*

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho possui o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio das seguintes linhas de fomento:

- Programas Regulares / Bolsas / No País / Doutorado Regular / Fluxo Contínuo: **2017/14703-4**

- Auxílio à Pesquisa / Regular: **2017/15365-5**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 MODY.....	1
3 DIABETES <i>MELLITUS</i> NEONATAL.....	3
4 DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR.....	6
5 OBJETIVOS	8
6 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
6.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	9
6.2 CASUÍSTICA	9
6.2.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO	11
6.3 BANCO DE AMOSTRAS	13
6.4 INVESTIGAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR	14
6.4.1 CAPTURA E ENRIQUECIMENTO	14
6.4.2 PREPARO DO <i>POOL</i> E AMPLIFICAÇÃO CLONAL (<i>CLUSTERIZATION</i>).....	15
6.4.3 SEQUENCIAMENTO	16
6.4.4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	16
6.4.5 PRIORIZAÇÃO DE GENES/VARIANTES CANDIDATAS	18
6.4.6 ANÁLISE DE TOLERÂNCIA A VARIANTES <i>LOSS OF FUNCTION</i> (LoF) E CARACTERIZAÇÃO DE HAPLOINSUFICIÊNCIA.....	21
6.4.7 CARACTERIZAÇÃO FRENTE A BASES DE DADOS DE MODELOS ANIMAIS NÃO HUMANOS E DE ESTUDOS GWAS	22
6.4.8 CLASSIFICAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS.....	23
6.4.9 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTES ALÉLICAS CANDIDATAS.....	24
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
7.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS	27
7.2 INVESTIGAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR	30
7.2.1 CONTROLE DE QUALIDADE E ESTATÍSTICA DESCRITIVA	30
7.2.2 PRIORIZAÇÃO ALÉLICA/GÊNICA	32
7.2.3 PROBANDO P2 - MODY NÃO <i>GCK</i>	39
7.2.4 PROBANDO P3 - MODY <i>GCK</i>	45
7.2.5 PROBANDO P5 - MODY NÃO <i>GCK</i>	50
7.2.6 PROBANDO P6 - MODY NÃO <i>GCK</i>	53
7.2.7 PROBANDO P9 - MODY NÃO <i>GCK</i>	56
7.2.8 PROBANDO P10 - MODY <i>GCK</i>	62
7.2.9 PROBANDO P11 - MODY NÃO <i>GCK</i>	67
7.2.10 PROBANDO P12 - MODY <i>GCK</i>	73
7.2.11 PROBANDO P13 - MODY NÃO <i>GCK</i>	78
7.2.12 PROBANDO P14 - MODY NÃO <i>GCK</i>	82
7.2.13 PROBANDO P15 - MODY NÃO <i>GCK</i>	85
8 CONCLUSÃO.....	88

9 ANEXOS..... 89
10 REFERÊNCIAS..... 132

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DE PROBANDOS COM SUSPEITA CLÍNICO-LABORATORIAL DE MODY OU DMN.....	10
FIGURA 2 - HEREDOGRAMA PROBANDO P2	39
FIGURA 3 - ESTRUTURA DO GENE <i>NOTCH1</i> - TRANSCRITO NM_017617.5	40
FIGURA 4 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA NOTCH1 MADURA	41
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO GENE <i>FOXC2</i> - TRANSCRITO NM_005251	43
FIGURA 6 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA FOXC2 MADURA	44
FIGURA 7 - HEREDOGRAMA PROBANDO P3	46
FIGURA 8 - ESTRUTURA DO GENE <i>GPR39</i> - TRANSCRITO NM_001508.3.....	46
FIGURA 9 - MODELO SERPENTINA DA PROTEÍNA GPR39.....	47
FIGURA 10 - HEREDOGRAMA PROBANDO P5	50
FIGURA 11 - ESTRUTURA DO GENE <i>TCF12</i> - TRANSCRITO NM_207037.1	50
FIGURA 12 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA TCF12.....	51
FIGURA 13 - HEREDOGRAMA PROBANDO P6	54
FIGURA 14 - ESTRUTURA DO GENE <i>OPAI</i> - TRANSCRITO NM_015560.2.....	54
FIGURA 15 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA OPA1	54
FIGURA 16 - HEREDOGRAMA PROBANDO P9	57
FIGURA 17 - ESTRUTURA DO GENE <i>SNX19</i> - TRANSCRITO NM_014758.2	57
FIGURA 18 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA SNX19	58
FIGURA 19 - ESTRUTURA DO GENE <i>FOXO1</i> - TRANSCRITO NM_002015.4.....	59
FIGURA 20 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA FOXO1	59
FIGURA 21 - HEREDOGRAMA PROBANDO P10	62
FIGURA 22 - ESTRUTURA DO GENE <i>CPE</i> - TRANSCRITO NM_001873.4.....	63
FIGURA 23 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA PRECURSORA PRÉ-PRÓ-CPE.....	63
FIGURA 24 - PROCESSAMENTO PÓS-TRADUCIONAL DE PRÓ-CPE	64
FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BIOSÍNTESE DA MOLÉCULA DE INSULINA	65
FIGURA 26 - HEREDOGRAMA PROBANDO P11	68
FIGURA 27 - ESTRUTURA DO GENE <i>MST1</i> - TRANSCRITO NM_020998.3.....	68
FIGURA 28 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA MST1	69
FIGURA 29 - ESTRUTURA DO GENE <i>COX8A</i> - TRANSCRITO NM_004074.3	71
FIGURA 30 - ESTRUTURA MULTIPROTEICA DO COMPLEXO IV (COX).....	72
FIGURA 31 - HEREDOGRAMA PROBANDO P12	74
FIGURA 32 - ESTRUTURA DO GENE <i>KL</i> - TRANSCRITO NM_004795.4.....	74
FIGURA 33 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA KLOTHO	75
FIGURA 34 - HEREDOGRAMA PROBANDO P13	79
FIGURA 35 - ESTRUTURA DO GENE <i>RASGRF1</i> - TRANSCRITO NM_002891.4.....	80
FIGURA 36 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA RASGRF1	80
FIGURA 37 - HEREDOGRAMA PROBANDO P14	83
FIGURA 38 - ESTRUTURA DO GENE <i>ZBED3</i> - TRANSCRITO NM_032367.4	83
FIGURA 39 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA ZBED3.....	84
FIGURA 40 - HEREDOGRAMA PROBANDO P15	85
FIGURA 41 - ESTRUTURA DO GENE <i>PTPRD</i> - TRANSCRITO NM_002839.3.....	86
FIGURA 42 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA PTPRD.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SUBTIPOS DE MODY E SEUS RESPECTIVOS GENES	2
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS GENÉTICO-MOLECULARES E CLÍNICAS DAS PRINCIPAIS CAUSAS DE DMN	5
TABELA 3 - BASES DE DADOS GENÔMICO POPULACIONAIS UTILIZADAS PARA AVALIAÇÃO DA FREQÜÊNCIA ALÉLICA NA COORTE INVESTIGADA.....	19
TABELA 4 - REGRAS DE INTERPRETAÇÃO PARA INFERÊNCIA DE HAPLOINSUFICIÊNCIA/INTOLERÂNCIA A VARIANTES LOF	22
TABELA 5 - DESCRITORES ONTOLÓGICOS UTILIZADOS PARA AVALIAR O COMPROMETIMENTO FUNCIONAL E, OU ESTRUTURAL PANCREÁTICO (ENDÓCRINO) DE OGMS DEPOSITADOS NA BASE DE DADOS MGI.....	22
TABELA 6 - TRAÇOS FENOTÍPICOS INVESTIGADOS NAS COORTES DOS ESTUDOS GWAS SELECIONADOS	23
TABELA 7 - REGRAS DE INTERPRETAÇÃO DOS DADOS DE COSSEGREGAÇÃO	25
TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS DOS PROBANDOS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE MODY	28
TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS DOS PROBANDOS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DMN	29
TABELA 10 - MÉTRICAS DE QUALIDADE (ACURÁCIA) DO SEQUENCIAMENTO/GENOTIPAGEM	30
TABELA 11 - MÉTRICAS DE COBERTURA VERTICAL DA REGIÃO-ALVO DE INTERESSE (CDS - REFSEQ).....	31
TABELA 12 - NÚMERO DE GENES PRIORIZADOS POR PROBANDO/FAMÍLIA	32
TABELA 13 - VARIANTES ALÉLICAS E GENES CANDIDATOS PRIORIZADOS EM ESTUDO DE EXOMA DE PROBANDOS/FAMÍLIAS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE MODY OU DMN.....	35
TABELA 14 - ESCALA CLINGEN DE ASSOCIAÇÃO FENOTÍPICA DE GENES CANDIDATOS PRIORIZADOS EM ESTUDO DE EXOMA DE PROBANDOS/FAMÍLIAS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE MODY OU DMN.....	37
TABELA 15 - NOVAS ASSOCIAÇÕES GÊNICAS EM DMM IDENTIFICADAS APÓS REALIZAÇÃO DE ESTUDO DO EXOMA	38
TABELA 16 - GENES CANDIDATOS À ASSOCIAÇÃO COM DMM PRIORIZADOS APÓS REALIZAÇÃO DE ESTUDO DO EXOMA	38

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - FORMULÁRIO ELETRÔNICO PARA O ENCAMINHAMENTO DE PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE MODY	89
ANEXO B - FORMULÁRIO ELETRÔNICO PARA O ENCAMINHAMENTO DE PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE DMN	109
ANEXO C - CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO GENE-FENÓTIPO - CLINGEN (<i>THE NIH-FUNDED CLINICAL GENOME RESOURCE</i>).....	127
ANEXO D - CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE VARIANTES ALÉLICAS - <i>THE AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS (ACMG) AND THE ASSOCIATION FOR MOLECULAR PATHOLOGY (AMP)</i>	130

RESUMO

Santana LS. *Estudo do exoma em famílias com diagnóstico clínico de MODY (maturity-onset diabetes of the young) e diabetes mellitus neonatal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

O diabetes *mellitus* (DM) compreende um grupo de alterações metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina e, ou sua ação. No diabetes *mellitus* monogênico (DMM), que corresponde a 1%-4% de todos os casos de diabetes *mellitus* diagnosticados abaixo dos 30 anos, o fenótipo é ocasionado por alterações genéticas ou epigenéticas em *loci* únicos. Possui uma etiologia genética extremamente heterogênea, com mais de 40 subtipos já descritos, cada um com seu fenótipo e padrão de herança característicos. MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) é o subtipo mais prevalente de DMM; e compartilha inúmeros de seus *loci* causais com a etiopatogenia de outra apresentação monogênica de DM, Diabetes *Mellitus* Neonatal (DMN). A confirmação do diagnóstico clínico, independente do subtipo, deve ser realizada por análise genético-molecular. O teste genético é demasiado importante para a precisa classificação do fenótipo, predição do provável curso clínico e adequado aconselhamento genético. Estudos em diferentes casuísticas de pacientes portadores de diabetes monogênico demonstram que os genes atualmente conhecidos como relacionados ao fenótipo ainda não explicam 100% dos casos clinicamente diagnosticados. O presente trabalho teve como objetivo identificar variantes causativas em genes ainda não conhecidos como relacionados aos fenótipos de MODY e Diabetes *Mellitus* Neonatal. Para isso foi realizado o estudo do exoma (*Whole Exome Sequencing*) em pacientes clinicamente diagnosticados e que possuem exame genético prévio negativo para alterações em todos os genes associados já descritos. Dezesesseis probandos com diagnóstico clínico de MODY (14) ou Diabetes *Mellitus* Neonatal (2), além de 5 familiares, foram submetidos ao sequenciamento e estudo do exoma. Em 68,7% (11/16) deles foi possível identificar 1 ou mais genes candidatos à associação fenotípica causal. Dentre aqueles com MODY, a taxa de descoberta foi de 60% (3/5) naqueles com diagnóstico clínico-laboratorial sugestivo de MODY *GCK* e 88,8% (8/9) em MODY não *GCK*. Nenhum gene candidato foi priorizado no grupo com DMN. Dentre os 14 *loci* únicos mapeados, recorrência, intracoorte ou na literatura médico-científica, foi observada em apenas 3 deles (*KL* | *PTPRD* | *ZBED3*). Destacamos ainda a identificação de alelo candidato no gene *OPAI1*, em paciente com apresentação atípica da já documentada Atrofia Óptica Autossômica Dominante com ou sem Surdez e Diabetes. Os resultados aqui obtidos possibilitam não apenas uma ampliação da heterogeneidade genética do DM de origem monogênica como também uma expansão no espectro de manifestações fenotípicas deste subtipo raro de disglucemia.

Descritores: Sequenciamento completo de exoma; Genética médica; Medicina molecular; Endocrinologia; MODY; Diabetes mellitus; Recém-nascido.

ABSTRACT

Santana LS. *Whole exome sequencing study in families with clinical diagnosis of MODY (maturity-onset diabetes of the young) and neonatal diabetes mellitus* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Diabetes *mellitus* (DM) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion/action. In monogenic diabetes *mellitus* (MDM), which corresponds to 1%-4% of DM diagnosed until the third decade of life, the phenotype is caused by genetic or epigenetic mutations in a single *locus*. MDM is genetically heterogeneous, with more than 40 associated genes, each one with its clinical characteristic and mendelian and no-mendelian inheritance pattern. MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) is the most prevalent MDM subtype, with a remarkable genetic etiology overlapping with Neonatal Diabetes *Mellitus* (NDM). Clinical diagnosis confirmation must be performed by genetic test, which is important for accurate phenotype classification, prediction of clinical course, and adequate genetic counseling. MDM genetic screening, in different cohorts, has been demonstrated that currently genes associated to this phenotype still do not explain 100% of clinically diagnosed cases. This study aimed to identify novel candidate genes not yet related to MODY and Neonatal Diabetes *Mellitus*. Whole Exome Sequencing (WES) study was performed in clinically diagnosed MODY and NDM patients who have a previous negative genetic test for genes already associated with which phenotype. Sixteen probands, 14 MODY and 2 NDM, in addition to 5 family members, were submitted to WES. In 68.7% (11/16) of them it was possible to identify 1 or more candidate gene for phenotypic association. The discovery rate among MODY probands was 60% (3/5) in those with MODY *GCK* and 88.8% (8/9) in MODY not *GCK*. No candidate genes were identified in NDM probands. Fourteen candidate *loci* were prioritized, with intracohort or literature recurrence in 3 of them (*KL* | *PTPRD* | *ZBED3*). Additionally, we identify a possible new phenotype spectrum of the Autosomal Dominant Optical Atrophy with or without Deafness and Diabetes (*OPAI*). This WES study will allow not only an expansion of MDM genetic heterogeneity, but also an extension in the phenotypic spectrum of this rare subtype of dysglycemia.

Descriptors: Whole exome sequencing; Genetics, medical; Molecular medicine; Endocrinology; MODY; Diabetes mellitus; Infant, newborn.

1 INTRODUÇÃO

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

De acordo com a *American Diabetes Association* (1) o DM pode ser classificado como: DM tipo 1 | DM1 (5%-10% dos casos no adulto), DM tipo 2 | DM2 (90%-95% dos casos), DM gestacional (1-38% das gestações) (2,3) e tipos específicos de DM, como o secundário a endocrinopatias (Síndrome de Cushing), doenças que afetam o pâncreas (fibrose cística; hemocromatose), induzido por medicamentos (betabloqueadores; antipsicóticos) e os de origem monogênica (1,4).

No diabetes *mellitus* monogênico (DMM), que corresponde a 1%-4% de todos os casos de diabetes *mellitus* diagnosticados abaixo dos 30 anos (5), o fenótipo é ocasionado por alterações alélicas em *loci* únicos, com influência ambiental/metabólica não determinística em seu desenvolvimento como no DM2 (4,6). Sua etiopatogenia pode estar relacionada a defeitos na função da célula- β pancreática, alterações no receptor de insulina ou como parte da apresentação clínica de síndromes genéticas (7).

Inúmeros padrões de herança mendeliana (autossômico/ligado ao X, dominante/recessivo) e não mendeliana (herança mitocondrial e epimutações) já foram descritas, podendo ocorrer, de maneira esporádica, como resultado de uma variante *de novo* (8,9). Possui uma etiologia genética extremamente heterogênea, com mais de 40 subtipos já descritos, cada um com seu fenótipo e padrão de herança característicos (8).

O DMM resultante de defeitos na função da célula- β pancreática possui como representantes **MODY** (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), **Diabetes Mellitus Neonatal** e **Diabetes Mellitus Mitocondrial**, sendo MODY o subtipo prevalente deste grupo de formas monogênicas de DM (7,10).

2 MODY

MODY é uma forma de diabetes não autoimune com padrão de herança autossômico dominante e elevada penetrância (8). Descrito pela primeira vez em 1960 (11), seu acrônimo MODY é utilizado desde 1975 (12).

Representa cerca de 1%-2% de todos os casos de diabetes. Clínico-laboratorialmente é caracterizado por 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” e início do quadro clínico na infância, adolescência ou adulto jovem (em geral antes dos 25 anos de idade) (8,13,14).

Na literatura científica, até o momento, 11 genes são frequentemente descritos, associados ao desenvolvimento do fenótipo (**Tabela 1**), com as três últimas relações reportadas nos últimos dez anos (15–17). Poucos casos já foram associados, também, aos genes *KLF11*, *PAX4* e *BLK*, porém sua verdadeira relação com o quadro clínico de MODY ainda é questionada (18,19).

Tabela 1 - Subtipos de MODY e seus respectivos genes

Gene	Subtipo	OMIM	Frequência	Características (20–22)
Genes frequentemente associados a MODY				
<i>HNF4A</i>	MODY <i>HNF4A</i>	#125850	2%-10% (23,24)	macrossomia; hipoglicemia neonatal; HDL baixo; sensibilidade à sulfonilureia
<i>GCK</i>	MODY <i>GCK</i>	#125851	20%-63% (23–25)	hiperglicemia leve não progressiva; pequeno incremento no TTOG
<i>HNF1A</i>	MODY <i>HNF1A</i>	#600496	9%-72% (23–26)	baixo limiar renal de absorção de glicose; baixos níveis de PCR; HDL alto; sensibilidade à sulfonilureia
<i>PDX1</i>	MODY <i>PDX1</i>	#606392	<1% (24)	disgenesia pancreática
<i>HNF1B</i>	MODY <i>HNF1B</i>	#137920	1%-6% (23,24)	disfunção renal; cistos renais; malformações urogenitais; alterações em eletrólitos, ácido úrico e enzimas hepáticas
<i>NEUROD1</i>	MODY <i>NEUROD1</i>	#606394	<1% (23,24)	pouco caracterizado
<i>CEL</i>	MODY <i>CEL</i>	#609812	raro (27)	pouco caracterizado
<i>INS</i>	MODY <i>INS</i>	#613370	raro (23)	pouco caracterizado
<i>ABCC8</i>	MODY <i>ABCC8</i>	#125853	raro (16)	sensibilidade à sulfonilureia
<i>KCNJ11</i>	MODY <i>KCNJ11</i>	#616329	raro (15)	sensibilidade à sulfonilureia
<i>APPL1</i>	MODY <i>APPL1</i>	#616511	raro (17)	pouco caracterizado
Associações gênicas questionadas				
<i>PAX4</i>	MODY <i>PAX4</i>	#612225	raro (27)	pouco caracterizado

Gene	Subtipo	OMIM	Frequência	Características (20–22)
<i>KLF11</i>	MODY <i>KLF11</i>	#610508	raro (27)	pouco caracterizado
<i>BLK</i>	MODY <i>BLK</i>	#613375	raro (27)	pouco caracterizado

HDL: High Density Lipoprotein; TTOG: Teste de Tolerância Oral à Glicose; PCR: Proteína C Reativa.

A confirmação do diagnóstico clínico de MODY, por meio do exame genético, e a consequente identificação de seu subtipo são fundamentais para o adequado manejo clínico, aconselhamento genético e diagnóstico precoce dos familiares sob risco (28), já que alguns casos possuem peculiaridades quanto ao tratamento e prognóstico (29).

Estudos em famílias de coortes europeias de países como Alemanha, França, Inglaterra e Espanha apresentam prevalência variável dos diferentes subtipos de MODY e predomínio marcante de MODY-*GCK* e MODY-*HNFI1A*, que correspondem de 10%-60% e de 20%-65% dos casos, respectivamente (30). No Brasil, de forma surpreendente, os subtipos mais frequentes (*GCK* e *HNFI1A*) possuem uma baixa prevalência em comparação a outros países, com o percentual de casos não *GCK* / não *HNFI1A* atingindo cerca de 60%-70% (25,30).

Mesmo sendo uma condição clínica rara, MODY consegue atingir estimativas populacionais consideráveis por estar inserido em uma doença bastante prevalente. Dados recentes destacam o Brasil como possuindo a quarta maior população (20 anos-79 anos) com DM no mundo, de quase 12,5 milhões de indivíduos (31). Este dado nos permite, com inúmeras considerações, estimar o número de casos de MODY no país em algumas centenas de milhares (125.000-250.000). Até 2017, entretanto, menos de 500 famílias brasileiras foram reportadas na literatura (25,30,32–35).

Estudo realizado com o intuito de identificar formas mais raras de MODY em nossa população constatou que mesmo após uma abordagem gênica ampliada, com a investigação dos 11 genes frequentemente descritos associados ao fenótipo, cerca de 50% dos casos ainda permanecem sem etiologia genética definida (MODY-X) (25,35), um valor maior do que o descrito pela literatura mundial (15%-20%) (23,24,26).

3 DIABETES *MELLITUS* NEONATAL

O diabetes *mellitus* neonatal (DMN) corresponde ao quadro de hiperglicemia diagnosticado até os 6 meses de vida. Em alguns casos pode ocorrer dos 6 meses aos 12 meses,

entretanto em sua maioria, nesta faixa etária, serão DM1 (28). De maneira inversamente proporcional, a apresentação clínica de DM1 é raríssima antes dos 6 meses de idade (20).

Possui incidência de um caso para cada cem mil nascidos vivos menores que 1 ano, sendo dividido em dois grandes grupos: **Diabetes Mellitus Neonatal Permanente** (DMNP) e **Diabetes Mellitus Neonatal Transitório** (DMNT) (28).

Independentemente do seguimento transitório ou permanente da hiperglicemia, esta pode ocorrer de maneira isolada ou como uma das primeiras manifestações de um quadro sindrômico, que inclui características extrapancreáticas como: anormalidades gastrointestinais (diarreia crônica); atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; defeitos cardíacos congênitos; hipotireoidismo congênito; cistos renais; surdez; baixa estatura; dentre outras (20,36,37).

Mais de 20 genes já foram descritos relacionados ao desenvolvimento de DMN, sendo alguns associados a manifestações pancreáticas/ extrapancreáticas específicas. Podem ser categorizados, ainda, dentro de uma das seguintes etiopatogenias já descritas: desenvolvimento pancreático anormal, anormalidades na função da célula- β pancreática e destruição da célula- β pancreática (28) (**Tabela 2**).

No **DMNT** ocorre remissão do diabetes nas primeiras semanas e, ou meses de vida, podendo haver recidiva em aproximadamente 50% dos casos, normalmente na infância tardia ou puberdade. Quase dez genes já foram descritos, associados ao seu desenvolvimento; entretanto, cerca de 70% dos pacientes possuem um defeito molecular que compromete o padrão de metilação/ expressão do gene *PLAGL1*, localizado na região cromossômica 6q24, como a hipometilação do alelo materno, duplicação do alelo paterno ou, ainda, a existência de uma dissomia uniparental paterna (28). Todos estes eventos resultariam em um aumento na expressão do referido gene e consequente desenvolvimento do fenótipo de **DMNT**.

A principal etiologia do **DMNP**, com mais de 22 genes associados, é a deficiência insulínica, decorrente de um comprometimento de secreção da célula beta pancreática (8). A maioria dos indivíduos com **DMNP** possuem variantes ativadoras dos canais de potássio dependentes de ATP - K_{ATP} (genes *KCNJ11* e *ABCC8*) (36,37), ou localizadas no gene da insulina (*INS*). Tais causas correspondem a cerca de 50%-75% dos casos já descritos (38-40).

Os genes *KCNJ11* e *ABCC8* codificam, respectivamente, as subunidades Kir6.2 e SUR1 dos canais K_{ATP} ; e sua abertura constante, decorrente da presença de variantes ativadoras, compromete a liberação de insulina em resposta à hiperglicemia (36,37,41). Cerca de 20% dos casos de DMN, devido a variantes alélicas patogênicas no gene *KCNJ11*, possuem um comprometimento neurológico como resultado de um quadro sindrômico denominado DEND

(*developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes*) (36). Comprometimento neurológico também pode ser observado em casos de DMN por variantes no *ABCC8*, entretanto em menor frequência e de maneira mais branda (37).

O comprometimento do gene *INS*, por sua vez, leva ao **DMNP** em virtude do efeito citotóxico de seu produto proteico. Um processamento pós-tradução incorreto dos precursores da molécula de insulina (pré-pró-insulina / pró-insulina) acarreta um acúmulo destes produtos no retículo endoplasmático rugoso com conseqüente estresse e morte celular (42).

A **Tabela 2** ilustra os principais genes e padrões de herança associados ao **DMNP** e **DMNT** (28).

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)	não mendeliano (erro de <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
	DMNT (hipoplasia pancreática)	dominante
<i>PTF1A</i>	DMNP (agenesia pancreática/displasia cerebelar)	recessivo
	DMNP (malformações cardíacas congênitas)	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 da célula-β pancreática		

Gene	Fenótipo	Padrão de herança
<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 DEND)	dominante recessivo
<i>KCNJ11</i>	DMNT ou DMNP (Síndrome DEND)	dominante
Destruição da célula-β pancreática		
<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

A identificação do subtipo de DMN é fundamental para determinar o tratamento mais adequado. Nos casos das variantes ativadoras nos genes que codificam as subunidades dos canais de K-ATP dependentes, por exemplo, 90% dos pacientes respondem ao tratamento com altas doses de sulfonilureias e suspensão da insulino-terapia, com melhora do controle glicêmico, do comprometimento neurológico e diminuição dos episódios de hipoglicemia (8).

4 DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR

A confirmação do diagnóstico clínico dos diferentes subtipos de DMM é realizada por análise genético-molecular (43,44).

O teste é extremamente importante não apenas para a confirmação do diagnóstico, como também para a identificação do subtipo fenotípico, predição do provável curso clínico e adequado aconselhamento genético, além de diagnóstico precoce e monitoramento clínico-laboratorial preventivo dos familiares sob risco (28,44).

É importante ressaltar que em alguns casos de DMM, como em MODY, a realização do rastreamento familiar genético em crianças nem sempre é obrigatória, uma vez que a avaliação da glicemia de jejum pode ser utilizada como um método de inferência barato e eficaz, ficando o estudo genético-molecular apenas para fins confirmatórios (45).

Em fenótipos relacionados a múltiplas formas de herança mendeliana, como em DMN, deve-se atentar sempre para a existência de casamentos consanguíneos entre heterozigotos e o risco de 25% de ocorrência de homozigotos afetados na prole (45).

A estratégia de investigação genético-molecular utilizada em DMM é influenciada pelos recursos técnicos e financeiros existentes e varia de acordo com o centro clínico/laboratório de pesquisa. Pode ser completamente guiada pelo fenótipo, com o sequenciamento do gene mais frequentemente associado àquela apresentação clínica (gene candidato), ou utilizar uma abordagem em larga escala para análise simultânea de todos os *loci* associados já descritos, o que permite o mapeamento de subtipos mais raros e consequente expansão da descrição clínica (20).

De modo adjuvante às técnicas de sequenciamento gênico, a avaliação de variações de número de cópias (grandes deleções/duplicações) pode ser realizada por protocolos de investigação mais específicos, como o MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), capaz de amplificar/quantificar cerca de 30-40 diferentes regiões do genoma ao mesmo tempo em apenas uma reação (46,47).

Independentemente do método utilizado (sequenciamento gênico para avaliação de variações pontuais/pequenos *indels* ou análise de *copy-number variations* - CNVs utilizando técnicas específicas) a clássica abordagem gene candidato, amplamente empregada no diagnóstico de inúmeras doenças de origem monogênica, pode ser onerosa e relativamente demorada (48,49), seja pelas características do método utilizado - *Sanger Sequencing* - ou pela necessidade de frequentes atualizações dos *loci*-alvos em painéis gênicos - *Targeted Sequencing* (50).

A redução de custos de abordagens mais robustas de sequenciamento em larga escala, como o *Whole Exome Sequencing* (WES), tem possibilitado a realização de investigações genéticas mais abrangentes e custo-efetivas, sobretudo em doenças geneticamente heterogêneas e com muitos indivíduos sem etiologia genética esclarecida, como em DMM (51).

Estudos em diferentes casuísticas de pacientes portadores de DMM demonstram que os genes atualmente conhecidos como relacionados ao fenótipo ainda não explicam 100% dos casos clinicamente diagnosticados. Em MODY, os casos geneticamente não esclarecidos (MODY-X) possuem uma prevalência mundial de cerca de 15%-50% (50% em nossa casuística) (23,24,26,35) e este número pode atingir cerca de 40% em **DMNT** (28,52) e 52% em **DMNP** (40% e 52% em nossa casuística, respectivamente) (28,36-40,52).

O elevado percentual de casos não esclarecidos observado em coortes locais, entretanto, pode ser um pouco menor devido à presença, ainda nos genes candidatos, de defeitos moleculares não evidenciados pelos métodos de investigação utilizados, como CNVs e

duplicações/ deleções de tamanho intermediário, além de variantes alélicas localizadas em regiões regulatórias e intrônicas profundas.

A maior parcela destes casos “negativos”, entretanto, pode estar relacionada ainda à composição geneticamente heterogênea de nossa população, construída após séculos de colonização e movimentos migratórios de indivíduos oriundos de dezenas de países (53). Tal característica poderia ter contribuído para a existência de um conjunto de genes associados aos fenótipos de MODY e, ou DMN não identificado nas populações nas quais a atual lista de *loci* candidatos foi mapeada, em geral a europeia (35).

Neste panorama, a utilização de abordagens genômicas amplas, como o WES, em casuística/ conjunto de familiares adequadamente selecionados e com elevada suspeição clínica, propiciaria descobertas de novas associações genótipo-fenótipo, ampliando consideravelmente o espectro de alterações clínicas e genéticas (15,17,54,55).

Por fim, a marcante relação etiológica que existe entre alguns fenótipos de DMM permitiria, também, um benefício múltiplo em estudos acerca de suas causas genético-moleculares. Os genes atualmente descritos associados a MODY, por exemplo, possuem uma grande sobreposição com as causas genéticas de DMN, com cerca de 50% de seus *loci* relacionando-se ao desenvolvimento de **DMNT** e, ou **DMNP** (Tabela 1 e Tabela 2).

5 OBJETIVOS

Objetivo geral: Identificar variantes causativas em genes ainda não conhecidos como relacionados aos fenótipos de **MODY** e **Diabetes Mellitus Neonatal**.

Objetivos específicos:

- Realizar o sequenciamento completo do exoma (*Whole Exome Sequencing*) de pacientes clinicamente diagnosticados com **MODY** ou **Diabetes Mellitus Neonatal**, que possuam exame genético prévio “negativo” para alterações em todos os genes já descritos associados a seu respectivo fenótipo.

- Ampliar a heterogeneidade genética dos fenótipos investigados.

6 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 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.

6.2 Casuística

Quinhentos e quarenta e um probandos com diagnóstico clínico-laboratorial sugestivo de MODY (508) ou DMN (33) foram encaminhados ao **Grupo de Diabetes Monogênico** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), por meio de transferências ambulatoriais internas ou por serviços externos, a partir de formulário eletrônico (disponível em www.diabetesgeneticosp.com) (ANEXO A e B) (56) entre março/2014 e outubro/2020. Duzentos e setenta e sete deles (51,2% - 277/541 | 244 MODY e 33 DMN) possuíam dados clínico-laboratoriais suficientes para avaliação e preencheram os critérios clínicos de inclusão, tendo sido submetidos ao fluxo de investigação genético-molecular descrito na **Figura 1**.

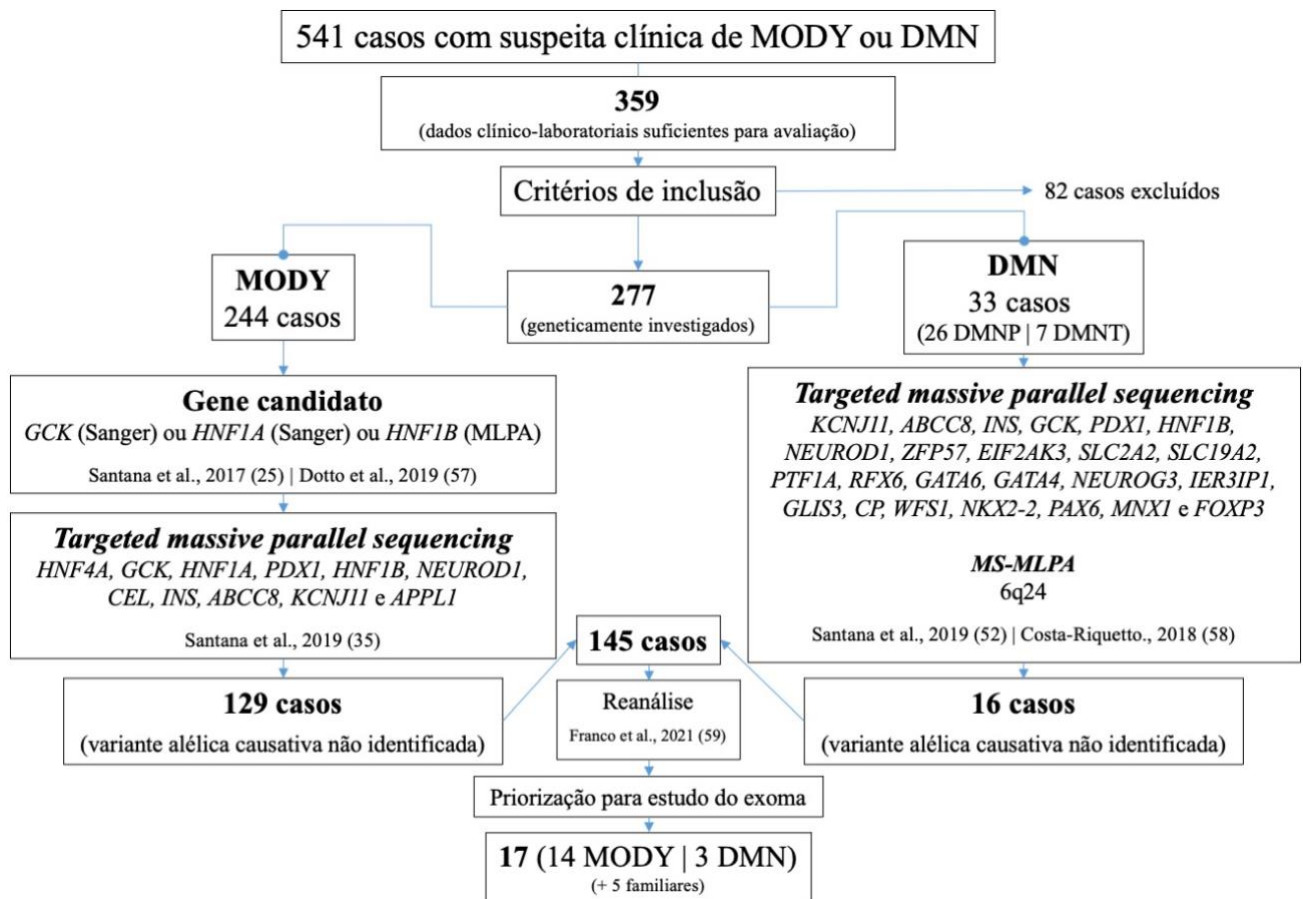


Figura 1 - Fluxograma de investigação genético-molecular de probandos com suspeita clínico-laboratorial de MODY ou DMN

Na casuística com diagnóstico clínico de MODY (244 casos), duas abordagens consecutivas e complementares de investigação genética foram utilizadas (com posterior publicação dos respectivos resultados obtidos):

- [1] Gene candidato (*Sanger sequencing* ou MLPA) com o sequenciamento das regiões codificadoras e fronteiras éxon-ínton (20pb) dos dois genes mais frequentemente associados a MODY, *GCK* | OMIM #125851 ou *HNF1A* | OMIM #600496, além da análise da presença de CNVs no gene *HNF1B* | OMIM #137920 (grandes deleções/inserções respondem por cerca de 50% dos casos já descritos) (25,57).

- [2] Painel gênico (*targeted massive parallel sequencing* - TMPS) com o sequenciamento das regiões *upstream*, codificadora e intrônica de todos os 11 genes frequentemente descritos associados a MODY (*HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PDX1*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *CEL*, *INS*, *ABCC8*, *KCNJ11* e *APPL1*) (35) (APÊNDICE C).

Aqueles com diagnóstico clínico de DMN (33 casos - 26 DMNP | 7 DMNT) foram submetidos diretamente ao painel gênico (TMPS) com o sequenciamento das regiões codificadoras e fronteiras éxon-íntron (20bp) de 24 genes já descritos, associados ao fenótipo (*KCNJ11*, *ABCC8*, *INS*, *GCK*, *PDX1*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *ZFP57*, *EIF2AK3*, *SLC2A2*, *SLC19A2*, *PTF1A*, *RFX6*, *GATA6*, *GATA4*, *NEUROG3*, *IER3IP1*, *GLIS3*, *CP*, *WFS1*, *NKX2-2*, *PAX6*, *MNX1* e *FOXP3*) (52,58). Devido à sobreposição gênica com MODY, regiões *upstream* e intrônica profunda dos genes *KCNJ11*, *ABCC8*, *INS*, *GCK*, *PDX1*, *HNF1B* e *NEUROD1* também foram sequenciadas.

Especificamente nos casos com diagnóstico clínico de DMNT foi realizada a pesquisa de defeitos que comprometessem a região diferencialmente metilada 6q24. Para isso foi utilizada uma técnica de MLPA modificada para esta finalidade, o *Methylation-specific – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*.

Em 52,3% dos casos (145/277 - 129 MODY e 16 DMN) nenhuma variante alélica causativa foi identificada, sendo proposto o estudo do exoma nestes e em aparentados selecionados, após reanálise dos dados genômico dos probandos, obtidos na etapa de investigação por TMPS (59).

6.2.1 Critérios de seleção

A avaliação dos dados clínico-laboratoriais para definir o diagnóstico de DM/glicemia de jejum alterada foi realizada de acordo com as recomendações da *American Diabetes Association (ADA) - Standards of Medical Care in Diabetes* (60). Os critérios de inclusão no protocolo do estudo foram aplicados aos dados obtidos de cada paciente em sua primeira avaliação em nosso serviço ou às informações presentes no questionário eletrônico de encaminhamento (preenchido por um pesquisador/pediatra/endocrinologista).

Em relação ao grupo com diagnóstico clínico de MODY, os critérios de seleção (21,45,61) utilizados foram:

- Diagnóstico de DM/glicemia de jejum alterada antes dos 35 anos em, ao menos, um indivíduo da família.
- História familiar uniparental de DM em, ao menos, duas gerações consecutivas.
- Ausência de obesidade e, ou resistência insulínica.

- Anticorpos anticélula β pancreática negativos: antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) e, ou autoanticorpo anti-insulina (IAA) e, ou anti-tirosina fosfatase (anti-IA2).
- Peptídeo C detectável (*cut-off* de 0,6 ng/mL pós estímulo - (20)) pós “lua de mel” (período após o diagnóstico de DM1 no qual a produção endógena de insulina pode persistir de 3 anos a 5 anos);

É importante destacar que os pacientes selecionados não preencheram, obrigatoriamente, todos os critérios listados. Como uma seleção menos rígida permite um aumento do número de casos de MODY geneticamente diagnosticados (62), algumas ponderações foram feitas quanto à exclusão dos candidatos à pesquisa:

- A história familiar de DM desconhecida ou ausente não foi considerada um critério de exclusão, caso o paciente possuísse outras características sugestivas de MODY.
- A presença de obesidade ou sobrepeso também não exclui totalmente a hipótese diagnóstica de MODY; pois, embora incomuns, não são características totalmente ausentes nesta população (63,64).
- A presença de apenas um anticorpo anticélula β pancreática em baixo título (considerado positivo caso ultrapasse o 99º percentil para o ensaio utilizado) não exclui o diagnóstico de MODY (anticorpos em baixo título são observados em até 1% dos casos de MODY, bem como em populações controle sem DM (65)).

Após estas ponderações, os seguintes critérios mínimos foram estabelecidos:

- Diagnóstico de DM/glicemia de jejum alterada antes dos 35 anos.
- Anticorpos anticélula β pancreática negativos ou em baixo título.
- Peptídeo C detectável após três anos do diagnóstico de DM.

No grupo com diagnóstico clínico do DMN, os seguintes critérios de seleção (20,28) foram utilizados:

- Diagnóstico de DM antes dos 6 meses de vida.

- Diagnóstico de DM entre 6 meses e 12 meses de vida com anticorpos anticélula β pancreática negativos.
- Diagnóstico de DM abaixo dos 6 meses ou entre 6 meses e 12 meses com anticorpos anticélula β pancreática positivos em indivíduo do gênero masculino na presença de uma ou mais das seguintes características: diarreia crônica, eczema, tireoidite, nefropatia, doença hematológica (quadro clínico sugestivo de Síndrome IPEX).

Além dos critérios citados, todos os pacientes com diagnóstico clínico de MODY e DMN devem possuir resultado negativo em avaliação genético-molecular prévia de genes candidatos, incluindo investigação oriunda do reprocessamento e reanálise (66) dos dados obtidos por painel gênico (TMPS). Este último realizado em projeto paralelo com o intuito de identificar defeitos genéticos raros (como aqueles em regiões intrônicas profundas e promotoras, além de variantes sinônimas raras e existência de variantes estruturais) na coorte de pacientes sequenciados.

Por fim, dentre aqueles candidatos ao estudo do exoma, foram selecionados 17 probandos (14 MODY | 3 DMN) e 5 aparentados, totalizando 22 indivíduos, divididos entre 3 núcleos familiares e 14 probandos isolados. Os seguintes critérios de priorização (numerados de acordo com sua importância) foram utilizados para a seleção final dos casos:

Na coorte de MODY: **[1]** idade ao diagnóstico de DM (preferencialmente ≤ 25 anos e idealmente ≤ 10 anos); **[2]** história familiar positiva com características clínico-laboratoriais que preencham os critérios mínimos de seleção; **[3]** paciente com material biológico de familiares já disponível; **[4]** acompanhamento clínico realizado em nosso serviço (disponibilidade de dados clínico-laboratoriais detalhados de seguimento); **[5]** resultado máximo (75%) no modelo de predição clínico-laboratorial para probabilidade de MODY (61).

Na coorte de DMN: **[1]** idade ao diagnóstico de DM (preferencialmente ≤ 6 meses de vida); **[2]** presença de manifestações extrapancreáticas; **[3]** paciente com material biológico de familiares já disponível; **[4]** acompanhamento clínico realizado em nosso serviço (disponibilidade de dados clínico-laboratoriais detalhados de seguimento).

6.3 Banco de amostras

Após o aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE B**), coletou-se amostra de sangue periférico, por punção venosa, em dois tubos

de coleta de 5mL, contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Durante a realização dos procedimentos práticos, empregou-se um método *in house* (*Salting-out*) para obtenção de DNA leucocitário a partir de amostras de sangue total periférico (67), além de um kit comercial (*illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare Life Sciences - EUA*) para a purificação do material genômico extraído com baixa qualidade.

A concentração do DNA foi obtida por leitura em espectrofotômetro NanoVue® (*GE Healthcare Life Sciences - EUA*) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A relação 260/280 nm, ideal para a caracterização da pureza do material, foi ser superior a 1,75. As amostras foram, então, armazenadas em freezer a -20°C até seu uso em biorrepositório sob a responsabilidade do pesquisador principal.

Todas as etapas descritas a seguir entre os itens 6.4.1-6.4.3 foram realizadas pela empresa BGI Genomics (Shenzhen, Guangdong, China) ou pela divisão Fleury Genômica, do Grupo Fleury (São Paulo, São Paulo, Brasil) em acordo firmado e fomentado pela FAPESP (Auxílio à Pesquisa / Regular: 2017/15365-5).

O processamento de dados detalhado entre os itens 6.4.4-6.4.8 foi realizado pelo pesquisador principal do projeto, na Unidade de Endocrinologia Genética (Divisão de Endocrinologia) do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

6.4 Investigação genético-molecular

6.4.1 Captura e enriquecimento

Sondas de RNA (*SureSelect Human All Exon V6, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia - EUA*) foram utilizadas, de acordo com o protocolo do fabricante, para captura e posterior enriquecimento de todas as regiões codificadoras do genoma humano (exoma) no processo de confecção de bibliotecas gênicas (*SureSelect^{XT}, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia - EUA*), constituído das seguintes etapas:

[1] Fragmentação do DNA: 200 ng de DNA genômico total de cada paciente foram submetidos à fragmentação mecânica por sonicação, gerando fragmentos de tamanho médio de 150pb (*Covaris, Woburn, Massachusetts - EUA*).

[2] Reparo das extremidades fragmentadas: os fragmentos de DNA gerados na etapa anterior tiveram suas extremidades reparadas com posterior poliadenilação em 3', o que

possibilita a incorporação de sequências nucleotídicas denominadas adaptadores (*Veriti 96-well thermal cycler, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts - EUA*).

[3] Ligação de adaptadores e amplificação clonal: adição de adaptadores às extremidades dos fragmentos reparados, permitindo posterior identificação molecular das amostras (sequências *index*) e amplificação clonal (*Veriti 96-well thermal cycler, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts - EUA*).

[4] Hibridação e enriquecimento: captura e enriquecimento (clonal) das regiões codificadoras do genoma humano, utilizando um complexo composto por *beads* magnéticas acopladas à estreptavidina e sondas de RNA biotiniladas complementares às regiões de interesse (*SureSelect Human All Exon V6, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia - EUA* | *Veriti 96-well thermal cycler, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts - EUA*).

[5] Identificação molecular: ao material capturado e enriquecido de cada paciente (biblioteca gênica) foi adicionada uma sequência identificadora (*index*) de 8pb com posterior amplificação clonal dos fragmentos identificados (*Veriti 96-well thermal cycler, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts - EUA*).

[6] Controle de qualidade: determinação do tamanho final das bibliotecas gênicas de cada paciente (*TapeStation 2200, kit D1000 Screen Tape System, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA*), com posterior quantificação por qPCR (*kit Kapa for Illumina Library Quantification, KK4824, Kapa Biosystems, Inc, Wilmington, Massachusetts, EUA* | *AriaMx Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA*).

6.4.2 Preparo do *pool* e amplificação clonal (*clusterization*)

Antes da realização da etapa de sequenciamento, as bibliotecas gênicas de cada paciente foram unificadas em um *pool* com concentração equimolar de 10nM, utilizando como base para os cálculos os dados de tamanho e concentração obtidos na etapa anterior. Após seu preparo, a concentração final de 10nM do *pool* foi confirmada por qPCR (*kit Kapa for Illumina Library Quantification, KK4824, Kapa Biosystems, Inc, Wilmington, Massachusetts, EUA* | *AriaMx Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA*).

O conteúdo do *pool* foi, então, diluído e depositado em uma lâmina de vidro denominada *flowcell*. Em sua superfície encontram-se fixados oligonucleotídeos complementares aos adaptadores existentes nos fragmentos das bibliotecas gênicas. A ligação inicial a estes oligonucleotídeos propicia uma amplificação clonal (*bridge PCR*) pré-

sequenciamento, denominada “*clusterization*”. Após esta etapa, os *amplicons* resultantes estarão ligados covalentemente à superfície da *flowcell* e preparados para o sequenciamento.

6.4.3 Sequenciamento

Foi empregado o método de determinação de cadeia síntese-a-síntese (68) durante o sequenciamento das regiões genômicas capturadas e enriquecidas, utilizando para isso a plataforma HiSeq2500 (*Illumina*, San Diego, Califórnia - EUA | *kit HiSeq SBS V4 2x125*, *Illumina*, San Diego, Califórnia - EUA).

Nesta etapa as moléculas *antisense* dos *amplicons* fixados à *flowcell* são removidas e um oligonucleotídeo iniciador (*primer*) é adicionado. Nucleotídeos molecularmente modificados e marcados com fluoróforos, o que permite sua distinção, são adicionados ao meio em que está a *flowcell*. Utilizando o *primer* existente, os nucleotídeos complementares são adicionados aos *amplicons* de fita simples em inúmeros ciclos de incorporação, com o escaneamento do comprimento de onda da fluorescência ao término de cada ciclo.

A sobreposição das imagens geradas permite não apenas o mapeamento (localização) de cada *amplicon* na superfície da *flowcell*, como também a determinação de sua sequência de nucleotídeos. Como o método de sequenciamento utilizado possui uma característica *paired end*, ao término do sequenciamento de toda a extensão dos *amplicons* existentes ocorre uma inversão destes fragmentos ligados à *flowcell*, com a realização de novos ciclos de incorporação de nucleotídeos fluorescentes, o que permite o sequenciamento de cada molécula também em seu sentido reverso.

Ao final da etapa de sequenciamento, arquivos brutos de sequências (.fastq) são gerados pela plataforma e estão prontos para serem submetidos a uma rotina de processamento de dados, utilizando programas específicos para cada etapa descritas a seguir.

6.4.4 Análise de bioinformática

Inicialmente os arquivos brutos de sequências precisam ser separados quanto à amostra de origem (identificação molecular), mapeados e alinhados ao genoma-referência, sendo posteriormente listadas todas as divergências existentes (variantes alélicas).

Em uma etapa posterior, denominada anotação, coletam-se de maneira automatizada informações de bases de dados biológicos públicos para cada uma das variantes

alélicas identificadas. Além disso, faz-se uma avaliação do impacto funcional, a partir do emprego de algoritmos de predição computacional (análise *in silico*).

Desta maneira, a análise dos dados ocorre de acordo com o fluxo de trabalho detalhado abaixo:

[1] *Demultiplexing*: a etapa inicial do fluxo de processamento dos dados consiste em separar as sequências dos fragmentos de cada paciente, utilizando a identificação molecular (sequência *index*) incorporada durante o preparo das bibliotecas gênicas. Esta etapa é necessária, pois todas as amostras são sequenciadas conjuntamente em um *pool* de fragmentos.

Software: bcl2fastq2 (69)

(*input file: multiplexed .fastq | output file: demultiplexed .fastq*)

[2] Análise de qualidade: checagem da estrutura/integridade dos arquivos, além do cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas por amostra.

Softwares: FASTQ Groomer (70) e *FASTQC* (71)

(*input file: .fastq | output files: groomed .fastq + estatísticas FASTQC*)

[3] Controle de qualidade: remoção da sequência dos adaptadores e de nucleotídeos e *reads* de baixa qualidade.

Software: FASTX-Toolkit (70)

(*input file: groomed .fastq | output file: clean .fastq*)

[4] 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*) (72)

(*input file: clean .fastq | output file: .bam - Binary Alignment Map*)

[5] Genotipagem: a partir do melhor alinhamento possível, é realizada a genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos existentes.

Software: FreeBayes (Bayesian genetic variant detector) (73)
(input files: .bam + .bed | output file: .vcf - Variant Call Format)

[6] Anotação: esta etapa consiste em (a) anotar as variantes identificadas, em relação ao genoma de referência, com informações de bases de dados biológicos e (b) simular, computacionalmente, o impacto funcional de cada uma.

Software: ANNOVAR (74)
(input file: .vcf | output file: .vcf anotado)

Todo o *workflow* de análise foi realizado utilizando um servidor local/*online* do projeto *Galaxy* (75–77) configurado em um Ubuntu versão 15.10.

6.4.5 Priorização de genes/variantes candidatas

Foi aplicado algoritmo heurístico de priorização às variantes presentes no arquivo .vcf anotado, com o intuito de gerar lista reduzida de genes/variantes candidatas a associação com o fenótipo.

Foram elaboradas duas abordagens de filtragem dos achados genômicos, [1] básico | mandatório e [2] complementar | heurístico:

[1] Básico | Mandatório:

- Frequência alélica em bases de dados genômico populacionais (Tabela 3):

- MODY (herança condicionada por modelo dominante): $\leq 0,006\%$ (1/15.000) - estabelecida de acordo com a frequência de um dos alelos (não patogênico) mais raro, mapeado em um gene frequentemente associado ao fenótipo de MODY (*HNFI1A*) (78).

- DMN (herança condicionada por modelo dominante): $\leq 0,001\%$ (1/100.000) - prevalência estimada de DMN entre nascidos vivos (79).
 - 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 (q^2) de 1/100.000 | 0,001%.
- **Localização genômica:** região codificadora e sítios canônicos de *splicing*.
- **Consequência molecular:** variantes não sinônimas pontuais, *indel*, *start-loss*, *start-gain*, *stop-gain*.
- **Cobertura vertical:** $\geq 10X$.
- **Expressão gênica:** genes com expressão, não necessariamente diferencial, em tecido pancreático (GTEx - *RNAseq* | BioGPS - *Microarray* | ProteomicsDB - Espectrometria de Massa) (80).
- **Modelo mendeliano de herança:**
- MODY (herança condicionada por modelo dominante): genótipo heterozigoto/hemizigoto.
 - DMN (herança condicionada por modelo dominante): genótipo heterozigoto/hemizigoto.
 - DMN (herança condicionada por modelo recessivo): heterozigoto composto/homozigoto/hemizigoto.

Tabela 3 - Bases de dados genômico populacionais utilizadas para avaliação da frequência alélica na coorte investigada

Base de Dados	Etnia / Região Geográfica / País	Alelos
<i>Genome Aggregation Database</i> ^{1,2} (gnomAD v.2.1.1 [£] v.3.1.1 [€]) (81)	Africana; Afro-americana; Latino-americana; Europeia (não Finlandesa); Europeia (Finlandesa); Judia ashkenazi; Asiática (leste); Asiática (sul)	282.912 [£] 152.312 [€]
Tohoku Medical Megabank Organization ² (ToMMo-4.7KJPN) (82)	Japão	9.546
<i>The Greater Middle East Variome Project</i> ¹ (GME - Variome) (83)	Grande Oriente Médio (Península Árabe; Nordeste Africano; Pérsia e Paquistão; Deserto Sírio; Península Turca)	4.994
GenomeAsia 100K Project ² (GAsP - Pilot) (84)	219 grupos populacionais e 64 países. Enriquecimento étnico: Índia; Malásia; Coreia do Sul; Paquistão; Mongólia; China; Papua Nova Guiné; Indonésia; Filipinas; Japão; Rússia	3.478
Arquivo Brasileiro Online de Mutações ^{1,2} (ABraOM - SABE-1171 SABE609) (85)	Brasil	2.412

Base de Dados	Etnia / Região Geográfica / País	Alelos
Iranome (86) ¹	Irã	1.600

Escala Genômica: ¹*Whole Exome Sequencing*; ²*Whole Genome Sequencing*.

[2] Complementar | heurístico:

- **Viés de sequenciamento:** parâmetros *strand bias* (scores SRP e SAP) e *placement bias* (score EPP) ≥ 20 - minimizam a chamada de alelos “falsos” devido ao viés de sequenciamento

- **Impacto funcional de variantes não sinônimas pontuais (predição *in silico*):**

- Variantes não sinônimas pontuais em região codificadora: algoritmo *Rare Exome Variant Ensemble Learner* (REVEL) (87): *cut-off* $\geq 0,7$.
- Variantes não sinônimas pontuais em sítios canônicos de *splicing*:
 - Algoritmo SpliceAI (88): *score* (0-1) de interpretação contínua - *cut-off* de confiança moderada $\geq 0,5$ - sensibilidade 71% (regiões exônicas flanqueadoras).
 - Algoritmo dbscSNV Ada (AdaBoost) (89): *score* (0-1) de interpretação contínua - *cut-off* ótimo $\geq 0,6$ - sensibilidade 100% | especificidade 77% | acurácia 87%.
 - Algoritmo RF (Random Forests) (89): *score* (0-1) de interpretação contínua - *cut-off* ótimo $\geq 0,6$ - sensibilidade 100% | especificidade 88% | acurácia 93%.

- **Tolerância a variantes *loss of function* (LoF):**

- Índice pLI gnomAD (*probability of being loss-of-function intolerant*): *cut-off* $\geq 0,9$ (extremamente intolerante a variantes LoF).
- *Score* o/e gnomAD (relação entre o número de variantes LoF observadas / número de variantes LoF esperadas): *cut-off* $< 0,35$ (gene sob grande pressão seletiva para variantes LoF).

- **Probabilidade de haploinsuficiência:** *score* HI DECIPHER (90) 0%-10% (grande probabilidade de haploinsuficiência).

- **Cascata de sinalização:** genes cujo produto proteico atua diretamente na cascata de sinalização de secreção de insulina e, ou do metabolismo da glicose (*PathCards - GeneCardsSuite*) (80,91).

- **Modelos animais não humanos:** gene submetido a *knockout* / *knockin* em cepa de camundongo que cursou com comprometimento funcional e, ou estrutural do pâncreas endócrino (*Mouse Genome Informatics Database*) (92).

- **Estudos de Associação Genômica Ampla:** genes que possuem alelos estatisticamente significativos ($p \leq 5 \times 10^{-8}$), após correção por múltiplos testes, mapeados em estudos

de associação genômica ampla (*Genome Wide Association Studies* - GWAS) de traços direta e indiretamente relacionados à hiperglicemia (*GWAS Catalog*) (93).

- **Plausibilidade biológica:** função biológica do produto proteico (*GeneCardsSuite*) (94).

A conclusão da análise dos dados genéticos de toda a coorte (17 probandos e 5 aparentados) permitiu, também, a realização de uma análise de recorrência. Um mesmo gene candidato identificado em dois ou mais indivíduos não aparentados é um forte elemento a favor de uma provável associação fenotípica de causalidade.

6.4.6 Análise de tolerância a variantes *loss of function* (LoF) e caracterização de haploinsuficiência

MODY e DMN são manifestações clínicas resultantes de um evento molecular com perda da função da célula- β pancreática e comprometimento da secreção de insulina. Devido a esta característica, os genes candidatos foram avaliados quanto à sua tolerância a variantes *loss of function* (LoF), utilizando o índice pLI (*probability of being loss-of-function intolerant*) e o *score o/e* (relação entre o número de variantes LoF observadas / número de variantes LoF esperadas) obtidos da base de dados gnomAD.

Enquanto o pLI é obtido a partir da quantificação da intolerância a variantes LoF pelo(s) transcrito(s) de um determinado gene, com base na relação entre o número de variantes observadas e previstas, o *score o/e* utiliza da mesma relação apenas no nível gênico (transcritos não considerados), sendo o valor esperado de variantes calculado, por meio de um modelo mutacional que leva em consideração a sequência nucleotídica, cobertura do sequenciamento e existência de modificações epigenéticas.

Adicionalmente a isto, sobretudo nos pacientes com diagnóstico clínico de MODY e de DMN com característica de transmissão dominante do fenótipo, a lista de genes candidatos também será submetida à caracterização de haploinsuficiência que corrobore o modelo de herança mendeliana esperado. Utilizamos para isso o *score* de haploinsuficiência (HI) obtido da base de dados DECIPHER (90).

O *score* de haploinsuficiência do DECIPHER é calculado, utilizando um modelo de predição baseado em dois conjuntos de dados: genes sabidamente haploinsuficientes e genes comprometidos por variantes LoF em, ao menos, dois indivíduos aparentemente saudáveis. Características como conservação da sequência nucleotídica, padrão de expressão gênica e

relação, em uma rede gênica, com genes sabidamente haploinsuficientes são utilizados como variáveis de predição.

A **Tabela 4** resume os valores de inferência de haploinsuficiência/tolerância a variantes LoF para cada parâmetro citado.

Tabela 4 - Regras de interpretação para inferência de haploinsuficiência/intolerância a variantes LoF

Parâmetro	Base de dados	Valor*	Interpretação
pLI	gnomAD	$\geq 0,9^a$	extremamente intolerante a variantes LoF
score o/e	gnomAD	$< 0,35^a$	gene sob grande pressão seletiva para variantes LoF
HI	DECIPHER	0%-10%	grande probabilidade de haploinsuficiência

*Variável de interpretação contínua. ^aValores de corte sugeridos (gnomAD) para a interpretação de fenótipos condicionados por herança mendeliana.

6.4.7 Caracterização frente a bases de dados de modelos animais não humanos e de estudos GWAS

Os genes candidatos foram avaliados quanto à existência de modelos animais não humanos (cepas de camundongos | OGM - Organismos Geneticamente Modificados) com comprometimento de seu respectivo ortólogo, além do mapeamento de alelos estatisticamente significativos em estudos GWAS.

Dados acerca de modelos OGMs foram recuperados do repositório de camundongos geneticamente modificados MGI (*Mouse Genome Informatics Database*) (92). Os descritores ontológicos utilizados para avaliar o comprometimento funcional e, ou estrutural do pâncreas (endócrino) estão descritos a seguir, na **Tabela 5**.

Resultados de estudos de associação foram obtidos da base de dados GWAS *Catalog* (93). Os genes candidatos foram avaliados quanto ao mapeamento de alelo(s) com valor estatístico p de associação, após correção por múltiplos testes, $\leq 5 \times 10^{-8}$ (95). Os traços utilizados para selecionar as coortes de interesse estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 5 - Descritores ontológicos utilizados para avaliar o comprometimento funcional e, ou estrutural pancreático (endócrino) de OGMs depositados na base de dados MGI

Descritor	Descrição	Repositório
MP:0001944	<i>abnormal pancreas morphology</i>	Mammalian Phenotype Ontology (MP) (96)
MP:0002693	<i>abnormal pancreas physiology</i>	
MP:0003562	<i>abnormal pancreatic beta cell physiology</i>	
MP:0003564	<i>abnormal insulin secretion</i>	
MP:0003934	<i>abnormal pancreas development</i>	
MP:0005215	<i>abnormal pancreatic islet morphology</i>	
MP:0005217	<i>abnormal pancreatic beta cell morphology</i>	

Descritor	Descrição	Repositório
MP:0009165	<i>abnormal endocrine pancreas morphology</i>	Human Disease Ontology (DO) (97)
MP:0010147	<i>abnormal endocrine pancreas physiology</i>	
MP:0014195	<i>abnormal endocrine pancreas secretion</i>	
DOID:4194	<i>glucose metabolism disease</i>	
DOID:9351	<i>diabetes mellitus</i>	
DOID:4195	<i>hyperglycemia</i>	
DOID:10603	<i>glucose intolerance</i>	
DOID:9993	<i>hypoglycemia</i>	
DOID:0050877	<i>pancreatic agenesis</i>	

OGM: organismo geneticamente modificado; MGI: Mouse Genome Informatics Database.

Tabela 6 - Traços fenotípicos investigados nas coortes dos estudos GWAS selecionados

Descritor	Traço	Repositório
EFO_0000400	<i>diabetes mellitus</i>	GWAS Catalog
EFO_0001360	<i>type ii diabetes mellitus</i>	
EFO_0004307	<i>glucose tolerance test</i>	
EFO_0004465	<i>fasting blood glucose measurement</i>	
EFO_0004468	<i>glucose measurement</i>	
EFO_0004541	<i>HbA1c measurement</i>	
EFO_0004593	<i>gestational diabetes</i>	
EFO_0005187	<i>C-peptide measurement</i>	
EFO_0006831	<i>acute insulin response measurement</i>	
EFO_0006833	<i>glucose effectiveness measurement</i>	
EFO_0006842	<i>diabetes mellitus biomarker</i>	
EFO_0008001	<i>insulin secretion measurement</i>	
EFO_0008036	<i>BMI-adjusted fasting blood glucose measurement</i>	
EFO_0008463	<i>glucagon measurement</i>	
EFO_0008464	<i>glucose-dependent insulintropic peptide measurement</i>	
EFO_0008465	<i>glucagon-like peptide-1 measurement</i>	
EFO_0008473	<i>insulin response measurement</i>	
EFO_0008531	<i>GLP-1-stimulated insulin response</i>	
EFO_0009698	<i>gestational blood glucose measurement</i>	
EFO_0009961	<i>Insulinogenic index measurement</i>	
EFO_0010120	<i>fasting blood glucose change measurement</i>	

6.4.8 Classificação dos genes candidatos

Todos os genes selecionados durante a etapa de priorização foram classificados quanto a seu grau de associação com o(s) fenótipo(s) já reportados(s), e os aqui investigados, de acordo com os critérios propostos pelo ClinGen (*The NIH-funded Clinical Genome Resource*) (98). O *framework* desenvolvido foi elaborado com o intuito de definir e avaliar associações gene-doença em fenótipos com padrão de herança mendeliano. As evidências de associação utilizadas podem ser oriundas de duas fontes analíticas principais: qualitativa e semiquantitativa (ANEXO C).

As **evidências qualitativas**, ou genéticas, ainda são subdivididas de acordo com o tipo de estudo (estudo de caso ou caso-controle) e avaliam características ligadas ao modelo de herança (autossômico dominante/ligado ao X ou autossômico recessivo), além de dados probabilísticos de cossegregação/investigação (*LOD score - logarithm of the odds*, poder estatístico e de detecção do teste, dentre outros).

As evidências **semiquantitativas**, ou experimentais, por sua vez, agregam dados funcionais (expressão, interação proteica, função biológica); de alteração funcional (células de indivíduos afetados, edição gênica) e oriundos de modelos *in vivo/in vitro* de “recuperação” da função/fenótipo.

Cada evidência observada, seja ela qualitativa ou quantitativa, resulta na atribuição de uma pontuação determinada pela diretriz. Por fim, a soma obtida se correlaciona a uma escala qualitativa de associação gene-fenótipo, podendo ser: **definitiva, forte, moderada, limitada, sem evidências** ou com **evidências conflitantes**.

6.4.9 Classificação das variantes alélicas candidatas

Todas as variantes alélicas candidatas identificadas em genes associados a fenótipos condicionados por herança mendeliana, de acordo com o OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*, foram classificadas quanto a seu grau de patogenicidade. Utilizamos nesta etapa os critérios de avaliação do *The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP)* (99).

A diretriz é constituída por um conjunto de critérios oriundos de quatro campos principais de avaliação: **dados populacionais, dados computacionais e preditivos, dados funcionais e análise de cossegregação**. Para cada variante, em cada um destes critérios, é atribuído um código com peso definido (**ANEXO D**). Ao final todos os códigos são combinados e um grau de patogenicidade final é atribuído à variante.

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

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

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

Para auxiliar a interpretação dos dados oriundos das análises de cossegregação familiar, foi incorporado à diretriz da ACMG/AMP um método matemático quantitativo (100).

O modelo proposto por Jarvik *et al.* (2016) é completamente integrado aos critérios da ACMG/AMP, possuindo pontos de corte bem definidos em relação à interpretação dos dados de cossegregação (**Tabela 7**). O resultado obtido expressa a probabilidade de a cossegregação ocorrer se a variante não for patogênica, utilizando para isso o número de meioses informativas.

Uma vantagem deste método é que múltiplos indivíduos afetados de diferentes famílias, com a mesma variante, podem ser combinados para obtenção de um número único de meioses informativas.

Tabela 7 - Regras de interpretação dos dados de cossegregação

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

N: probabilidade de cossegregação se a variante não for patogênica

***número mínimo de meioses necessárias.**

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

Desta maneira, a probabilidade de a variante cossegregar ao fenótipo, apenas por acaso, será de $N = \left(\frac{1}{2}\right)^m$, em que m é o número de meioses informativas da variante de interesse.

Exemplo 1 (modelo dominante): em uma família possuímos três filhos afetados, portadores da variante, sendo um deles o probando, com o único parental afetado já falecido e

sem dados de genotipagem. Como assumimos que o probando é portador da variante com penetrância completa do fenótipo, existem apenas mais duas meioses informativas a serem consideradas (seus irmãos). Sendo assim, temos que $N = (\frac{1}{2})^2 = 1/4$ (probabilidade de cossegregação ao fenótipo, se a variante não for patogênica). Devemos destacar que o resultado não é $1/8$, pois a probabilidade de o probando possuir a variante já é igual a 1.

Exemplo 2 (modelo recessivo): em uma família há dois irmãos homozigotos afetados, sendo um deles o probando, oriundos de um casamento consanguíneo entre pais sem o fenótipo e sabidamente heterozigotos para a variante em questão. Assumindo que o probando possui ambas as variantes e penetrância completa do fenótipo, apenas as duas meioses informativas do irmão homozigoto serão consideradas. Sendo assim, temos que $N = (\frac{1}{2})^2 = 1/4$ (probabilidade de cossegregação de ambas ao fenótipo, se a variante não for patogênica).

Nos exemplos acima, as probabilidades obtidas não atingem o ponto de corte mínimo de $1/8$ quando dados são oriundos de apenas uma família, não representando uma evidência de patogenicidade significativa, levando em consideração a integração do modelo matemático com os critérios da ACMG/AMP. Entretanto, se o mesmo valor N ($1/4$) fosse obtido por dados de meioses informativas oriundos de duas ou mais famílias, possuiríamos uma evidência mínima de patogenicidade (corroborante), demonstrando a importância da recorrência de variantes em famílias geneticamente não relacionadas.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da coorte selecionada para estudo do exoma, composta por 17 probandos sem variantes alélicas causativas identificadas em investigação genético-molecular prévia, 14 possuem um diagnóstico clínico de MODY e 3 de DMN. Adicionalmente, 5 aparentados disponíveis pertencentes a 3 núcleos familiares de probandos com MODY também tiveram seu exoma sequenciado.

Nenhum familiar dos três pacientes com DMN selecionados possuía material coletado disponível para inclusão no estudo. Algumas características dos possíveis modelos de herança associados ao fenótipo e dinâmica de recrutamento da coorte foram responsáveis por isso: [1] ausência de recorrência familiar de DMN entre os casos referenciados (heranças autossômica / ligada ao X recessiva) e [2] encaminhamento de casos majoritariamente por

serviços externos - consultórios/clínicas/hospitais em outros estados. Tais elementos culminaram na não coleta inicial de material de familiares ou na dificuldade de obtê-lo posteriormente, no decorrer do protocolo genético de investigação.

7.1 Características clínico-laboratoriais

Dentre os probandos com MODY, 35,7% (5/14) possuíam especificamente uma suspeita clínica de MODY-*GCK* e 64,3% (9/14), de MODY não *GCK*. Dentre aqueles com registro de peso ao diagnóstico (13/14), nenhum apresentava obesidade/sobrepeso na época, sendo que mais da metade, 77% (10/13), possuía peso normal ou baixo peso. Histórico familiar de DM/pré-DM foi observado em todos os pacientes selecionados, com no mínimo uma recorrência na mesma geração do probando.

O tratamento medicamentoso mais frequente ao diagnóstico (dado disponível - 13/14) foi a insulino-terapia ou o uso de hipoglicemiantes orais (77% - 10/13), administrados ou não em associação. Três pacientes apresentaram (dado disponível - 13/14) complicações microvasculares; 15,3% (2/13), microalbuminúria e 7,7% (1/13), retinopatia diabética não proliferativa). Dos cinco familiares de probandos com MODY incluídos no estudo, 80% (4/5) possuíam DM/pré-DM, sendo ao total: 1 mãe, 1 pai, 2 primos em primeiro grau e 1 irmão.

Em relação ao grupo de DMN, todos possuem um quadro permanente de hiperglicemia com diagnóstico antes dos 6 meses de vida, um deles apresenta adicionalmente sinais/sintomas extrapancreáticos: arterite de Takayasu (101) e dedo em gatilho.

As características clínico-laboratoriais da coorte de pacientes selecionados estão detalhadas nas **Tabelas 8 e 9**.

Tabela 8 - Características clínico-laboratoriais dos probandos com diagnóstico clínico de MODY e seus familiares

ID	Idade ao diagnóstico de DM ou GJA ^a /idade na primeira investigação genética (anos)	Peso referido ao diagnóstico ^b	Parentesco/História familiar de DM-GJA (G) ^c	Tratamento ao diagnóstico	Tratamento atual	Variação de GJ ^d (mg/dL) seguimento	Variação de A1C ^e (%) seguimento	Peptídeo C ^f (ng/mL) seguimento	Comp.Mic
P2	24/34	normal	positiva (1)	insulina	ADO ^{1,2}	119-258	5,0-11,1	1,2	ausentes
P3	5/10	normal	positiva (3)	dieta	dieta	96-108	5,5-6,1	1,5	M
P3.1	23/NA	obesidade	prima - 1º grau	ADO ²	ND	114-154	6,3-ND	ND	ausentes
P3.2	26/NA	obesidade	prima - 1º grau	ADO ²	ND	95-107	5,5-5,6	ND	ausentes
P4	25/26	sobrepeso	positiva (2)	ND	ND	105-ND	5,6-ND	ND	ND
P5	3/64	baixo peso	positiva (3)	insulina	ADO ^{1,2}	116-250	6,6-10,5	2,8	ausentes
P6	23/29	normal	positiva (3)	ADO ^{1,2}	insulina/ADO ¹	50-300	6,2-7,6	1,1	ausentes
P7	35/44	normal	positiva (3)	dieta	ADO ²	96-116	5,6-5,9	3,3	ausentes
P8	22/57	baixo peso	positivo (2)	ADO ^{1,2}	insulina/ADO ²	108-217	6,8-9,2	0,3 ^g	RDNP
P8.1	28/NA	normal	irmão	ADO ND	insulina	ND	ND	ND	ND
P9	19/37	normal	positivo (2)	insulina	insulina	131-215	5,7-8,4	ND	M
P10	15/23	baixo peso	positivo (3)	ADO ²	dieta	102-180	6,0-6,8	0,85	ausentes
P11	30/42	normal	positivo (2)	insulina/ADO ^{1,2,3}	insulina/ADO ^{1,2,3}	100-250	7,9-13	0,9	ausentes
P12	4/10	ND	positivo (3)	ADO ⁴	dieta	105-126	5,1-6,0	1,9	ausentes
P12.1	sem DM/GJA	NA	mãe	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P12.2	36/NA	sobrepeso	pai	dieta	dieta	95-105	5,7-5,9	2,3	ausentes
P13	9/12	sobrepeso	positivo (3)	dieta	insulina	81-207	7,0-8,6	0,42 ^h	ausentes
P14	22/22	normal	positivo (3)	insulina	insulina/ADO ¹	76-195	5,7-13,5	1,4	ausentes
P15	11/16	sobrepeso	positivo (2)	insulina	insulina/ADO ²	84-120	8,9-9,9	1,1	ausentes

^aGJA: glicemia de jejum alterada; ^brelatado pelo paciente/médico solicitante; ^chistória familiar - G: número de gerações; ^dGJ: glicemia de jejum; ^eA1C: hemoglobina glicada; ^fpeptídeo C de jejum: três anos após o diagnóstico de DM; comp.mic (complicações microvasculares): RDNP - retinopatia diabética não proliferativa; M - microalbuminúria; ^gdosagem de peptídeo C pós-pancreatectomia parcial (cistoadenoma pancreático); ^hdosagem de peptídeo C em jejum (sem estímulo) (*cut-off* de seleção não aplicado). ADO (antidiabético oral): ¹sulfonilureia; ²metformina; ³inibidores da dipeptidil peptidase 4 (iDPP4); ⁴pioglitazona; ND: não disponível; NA: não aplicável.

Intervalos de referência: GJ (hexoquinase) 70 - 99 mg/dL; A1C (HPLC) 4,1 - 6,0 %; peptídeo C de jejum (quimioluminescência) 1,1 - 4,4 ng/mL; microalbuminúria (imunoturbidimetria) <14,0 mg/L.

Tabela 9 - Características clínico-laboratoriais dos probandos com diagnóstico clínico de DMN

ID	Gênero ^a	Idade ao diagnóstico de DM/Idade na primeira investigação genética	Permanência do DM	Tratamento ao diagnóstico	Tratamento atual	GJ ^b (mg/dL) diagnóstico	A1C ^c (%) Mín.-Máx.	Anticorpos ^d (tempo de dosagem após o diagnóstico)	Manifestações extrapancreáticas ^e
P17	M	1 mês / 12 anos	permanente	insulina	insulina	200	8,6-ND	NR ^{1,2,3} (12 meses)	ausentes
P18	F	1 mês / 38 anos	permanente	ADO*	insulina	ND	9,0-10,1	ND	ausentes
P19	F	3 meses / 37 anos	permanente	insulina	insulina	ND	6,8-10,9	NR ^{1,2} (37 anos)	arterite de Takayasu / dedo em gatilho

^aGênero: M - masculino, F - feminino; ^bGJ: glicemia de jejum; ^cA1C: hemoglobina glicada; ^danticorpos anticélula β pancreática: ¹antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), ²antitirosina fosfatase (anti-IA2) e ³autoanticorpo anti-insulina (IAA); ADO (antidiabético oral): *informação detalhada não disponível; ND: não disponível; NR: não reagente. Intervalos de referência: GJ (hexoquinase) 70 - 99 mg/dL; A1C (HPLC) 4,1 - 6,0 %; anti-GAD / anti-IA2 (imunoensaio enzimático): não reagente <10,0 UI/mL; IAA (ensaio de radio-ligação): não reagente <0,4 U/mL.

7.2 Investigação genético-molecular

7.2.1 Controle de qualidade e estatística descritiva

O controle de qualidade dos dados de sequenciamento é uma etapa crucial para assegurar a confiabilidade dos achados a serem priorizados e interpretados. Com exceção da amostra P17 (DMNP), o conjunto de alelos observados nesta coorte de estudo apresentou elevada acurácia de sequenciamento e genotipagem (chamada de variantes) (**Tabela 10**), mensurados pelos seguintes parâmetros: **1]** percentual de variantes com um *score phred Q* >40 (102,103); **2]** razão entre heterozigotos/homozigotos e **3]** razão entre transições/transversões (104).

Tabela 10 - Métricas de qualidade (acurácia) do sequenciamento/genotipagem

	Nº variantes / Nº genes	% <i>phred score Q</i> ¹ >40	Hom/Het ²	Ti/Tv ³
P2	154.684 / 18.874	99%	0,50	2,93
P3	165.825 / 19.477	99%	0,47	3,02
P3.1	162.564 / 19.334	99%	0,47	2,95
P3.2	160.516 / 19.265	99%	0,46	2,96
P4	142.430 / 18.391	99%	0,67	2,92
P5	146.326 / 18.576	99%	0,53	2,97
P6	143.611 / 18.820	99%	0,57	2,94
P7	144.318 / 18.651	99%	0,59	2,89
P8	162.032 / 19.860	99%	0,46	2,89
P8.1	161.953 / 19.820	99%	0,47	3,00
P9	162.058 / 20.005	99%	0,50	2,94
P10	153.090 / 19.352	99%	0,47	2,92
P11	143.531 / 19.014	99%	0,53	2,95
P12	140.147 / 18.727	99%	0,57	2,93
P12.1	142.266 / 18.734	99%	0,55	2,94
P12.2	146.002 / 18.864	99%	0,56	2,97
P13	153.078 / 19.277	99%	0,49	2,97
P14	156.604 / 19.523	99%	0,49	2,93
P15	142.505 / 18.887	99%	0,54	2,93
P17	66.246 / 16.677	89%	0,44	2,44
P18	153.209 / 19.014	99%	0,48	2,98

	Nº variantes / Nº genes	% <i>phred score</i> $Q^1 >40$	Hom/Het ²	Ti/Tv ³
P19	152.382 / 19.494	99%	0,46	2,99

¹*phred score* Q : propriedade logarítmica relacionada à probabilidade de erro P na chamada de variantes de um dado *locus* ($Q = -10 \log_{10} P$). $Q = 40$ corresponde a uma probabilidade de genotipagem incorreta de 1:10.000 (acurácia de 99,99%); ²Hom/Het: razão entre o número de variantes em homozigose e heterozigose. Valores matematicamente esperados para dados de sequenciamento do exoma: 0,45-0,80; ³Ti/Tv: razão entre o número de substituições de nucleotídeos do tipo transições e transversões. Valores matematicamente esperados para dados de sequenciamento do exoma: 2,6-3,2.

Além disso, as 22 amostras sequenciadas apresentaram uma boa cobertura vertical (número de vezes em que uma mesma base é determinada por diferentes fragmentos sequenciados - *reads*), com elevada taxa de mapeamento dos *reads* obtidos à referência do genoma humano utilizada (hg19) (**Tabela 11**). É importante destacar que a região-alvo utilizada para a obtenção das métricas de cobertura vertical (média | %>=10X | %>=20X) foi aquela referente à área codificadora (CDS - *coding sequence*) dos genes do genoma humano (hg19) depositados no RefSeq - NCBI.

Tabela 11 - Métricas de cobertura vertical da região-alvo de interesse (CDS - RefSeq)

	Dados (GB)*	Taxa de mapeamento - hg19 (%)	Média	%>=10X [‡]	%>=20X [‡]
P2	4,9	99,98	89,11	98,89	96,77
P3	5,1	99,98	88,22	99,15	96,64
P3.1	4,4	99,98	80,87	98,79	96,03
P3.2	4,8	99,98	88,00	98,94	96,64
P4	4,5	99,97	78,93	98,92	95,64
P5	4,9	99,98	85,79	98,91	96,42
P6	4,5	99,98	75,92	98,69	95,55
P7	4,7	99,98	80,33	98,99	95,98
P8	5,1	99,97	90,13	99,20	96,57
P8.1	4,9	99,98	88,78	99,19	96,54
P9	4,2	99,98	74,74	98,58	94,69
P10	5,1	99,98	91,89	98,96	96,54
P11	3,8	99,99	73,97	98,55	94,68
P12	4,3	99,99	80,58	98,91	95,30
P12.1	4,5	99,98	84,84	98,85	96,11
P12.2	4,4	99,98	78,95	98,90	95,50
P13	4,8	99,97	92,00	98,92	96,73

	Dados (GB)*	Taxa de mapeamento - hg19 (%)	Média	%>=10X [‡]	%>=20X [‡]
P14	4,6	99,99	88,86	99,08	96,45
P15	4,4	99,99	86,83	98,83	96,13
P17	2,6	99,98	80,00	97,96	93,83
P18	4,8	99,98	82,80	98,87	96,15
P19	4,6	99,99	87,17	98,89	96,21

*Dados (GB - *Gigabytes*): Arquivo BAM (*Binary Alignment Map*) - dados de sequenciamento pós-tratamento de qualidade e alinhamento ao genoma referência humano (hg19); [‡]Percentual de bases na região alvo com no mínimo 10X e 20X de cobertura vertical.

7.2.2 Priorização alélica/gênica

Cada paciente da coorte investigada, probandos e aparentados, apresentou em média 147.000 variantes alélicas, distribuídas entre regiões codificadoras e fronteiras éxon-íntron do genoma, além de regiões 5' e 3' UTR, *downstream*, *upstream* e intergênicas dos genes sequenciados.

A **Tabela 12** apresenta, para cada probando, o número de genes que preencheram os critérios de filtros básico | mandatório e complementar | heurístico de priorização (tópico 6.4.5). É importante destacar que os dados genômicos oriundos do sequenciamento da amostra P17 não foram submetidos à etapa de priorização, uma vez que suas métricas de qualidade não puderam assegurar à acurácia dos alelos genotipagem, comprometendo assim sua correta interpretação.

Tabela 12 - Número de genes priorizados por probando/família

	Diagnóstico Clínico	Nº de genes com variantes genotipadas	Nº de genes após priorização
P2	MODY não <i>GCK</i>	18.874	2
P3*	MODY <i>GCK</i>	19.477	1
P4	MODY <i>GCK</i>	18.391	0
P5	MODY não <i>GCK</i>	18.576	1
P6	MODY não <i>GCK</i>	18.820	1
P7	MODY <i>GCK</i>	18.651	0
P8*	MODY não <i>GCK</i>	19.860	0
P9	MODY não <i>GCK</i>	20.005	2
P10	MODY <i>GCK</i>	19.352	1
P11	MODY não <i>GCK</i>	19.014	2

	Diagnóstico Clínico	Nº de genes com variantes genotipadas	Nº de genes após priorização
P12*	MODY <i>GCK</i>	18.727	1
P13	MODY não <i>GCK</i>	19.277	2
P14	MODY não <i>GCK</i>	19.523	1
P15	MODY não <i>GCK</i>	18.887	2
P17	DMN Permanente	16.677	NA ¹
P18	DMN Permanente	19.014	0
P19	DMN Permanente	19.494	0

*Probandos com um ou mais aparentados disponíveis no momento da investigação genética e incluídos no estudo do exoma; ¹ Priorização gênica/alélica não realizada devido à baixa qualidade dos dados genômicos obtidos; NA: não aplicável.

Em 68,7% (11/16) dos probandos investigados foi possível identificar um ou mais genes candidatos à associação fenotípica causal, sendo 60% (3/5), dentre aqueles com diagnóstico clínico-laboratorial de MODY *GCK* e 88,8% (8/9), dentre os MODY não *GCK* (**Tabela 13** e **Tabela 14**). Nenhum gene candidato foi priorizado no grupo com DMN.

Desde 1992, com a associação de *GCK* como a primeira causa monogênica de hiperglicemia (105), inúmeras abordagens de descoberta foram empregadas no mapeamento dos atuais *loci* associados a este fenótipo. O advento dos novos métodos de sequenciamento em larga escala permitiu ir além dos estudos de ligação e investigações baseadas em genes candidatos, estabelecendo um modelo genômico agnóstico de pesquisa (106).

Até o momento, o estudo do exoma já propiciou a identificação de seis novas causas de diabetes *mellitus* monogênico (**Tabela 15**), com o mapeamento de alelos em genes candidatos cuja função sobre a homeostase glicêmica era, até então, desconhecida (106).

Uma característica comum a todas essas descobertas foi a utilização de famílias para mapeamento inicial do *locus* candidato, com posterior reprodução do resultado em coortes maiores compostas apenas por probandos. A utilização de poucos trios em nossa abordagem de estudo, discutida nas seções anteriores, foi responsável por gerar listas maiores de genes candidatos durante a etapa de priorização, resultando em maior tempo dispendido na curadoria individual dos achados. Não acreditamos que tal abordagem tenha comprometido significativamente o percentual de descoberta, entretanto admitimos que o mapeamento de eventos *de novo*, frequentemente observado nas novas associações gene-fenótipo (**Tabela 15**), não pode ser testado.

Além das descobertas compiladas por De Franco *et al.* (2020), e destacadas na **Tabela 15**, estudos similares ao nosso já foram anteriormente realizados, revelando diferentes *loci* candidatos (**Tabela 16**).

Variações no desenho experimental e modelo de recrutamento dos casos investigados em cada uma dessas publicações não permitem comparação direta entre os percentuais de descoberta observados, que variaram de 20%-50%, dentre aqueles, utilizando famílias ou coortes de probandos como abordagem investigativa.

Além da recorrência intercoortes observada nos genes *PTPRD* e *ZBED3*, mapeados respectivamente por Shim *et al.* (2015) (107) e Stankute *et al.* (2020) (108) em coortes com suspeita clínico-laboratorial de DMM, variantes alélicas candidatas distintas no gene *KL* foram priorizadas em dois probandos do presente estudo, sendo todos os demais achados moleculares únicos.

Curiosamente não observamos nenhum *locus* candidato nos casos com DMN selecionados, além de três casos com MODY. Algumas características de nosso modelo experimental podem explicar a não identificação de *loci* candidatos nesses pacientes:

1] Variantes estruturais: a triagem genética de recrutamento empregada avaliou a presença de CNVs apenas nos casos com suspeita clínico-laboratorial de MODY *HNF1B*, não descartando a existência desses defeitos moleculares em uma abordagem agnóstica, seja por *MLPA* ou utilizando dados do sequenciamento completo do exoma (109).

2] Regiões não codificadoras: a abordagem de priorização alélica aqui utilizada contemplou apenas a região codificadora, e fronteiras éxon-íntron, do exoma. Não foram investigadas regiões regulatórias, como promotores, *enhancers* ou *silencers*, com documentada participação na patogênese dos fenótipos investigados (110–112), ou mesmo a possibilidade de comprometimento do mecanismo de *splicing* por variantes não sinônimas ou localizadas em sítios não canônicos.

3] Eventos mutacionais *de novo*: a inclusão majoritária de probandos em nossa coorte de estudo não permitiu, principalmente, uma adequada avaliação da presença de defeitos moleculares não herdados, sobretudo nos casos com história familiar ausente ou atípica.

As seções seguintes foram dedicadas a detalhar as evidências de associação causal dos genes candidatos em cada probandos/famílias em que foram identificados.

Tabela 13 - Variantes alélicas e genes candidatos prioritizados em estudo de exoma de probandos/famílias com diagnóstico clínico de MODY ou DMN

ID	Variante ID	Zigosidade	ACMG ¹	Frequência Alélica ² (HT HO)	Gene (OMIM) Região	GWAS ³ (alelo <i>p</i>)	pLI o/e - gnomAD ⁴	HI - DECIPHER ⁵	MGI - ID Genótipos ⁶ (pâncreas endócrino)
P2	p.Leu2304Val rs749993527	HET	S.I (PM2)	0,0008% (2 0) ^ε	<i>NOTCH1</i> (*190198) TAD	rs201053795 ^R $\times 10^{-7}$	1,0 0,05	0,16%	2684337 ^a 4436916 ^a 4943528 ^a 4943527 ^a 5460865 ^a 5460862 ^a
	p.Met453Ile rs1003293974	HET	S.I (PM2)	0,0004-0,0006% (2 0) ^ε	<i>FOXC2</i> (*602402) AD-2	ND	0,13 0,3	5,65%	ND
P3	p.Met72Ile rs981403635	HET	NA	0,0004% (1 0) ^ε	<i>GPR39</i> (*602886) TM2	ND	0,0 1,2	51,56%	3702556 ^b
P5	p.Gly64Ala ND	HET	S.I (PM2 BP1)	ausente	<i>TCF12</i> (*600480) NA	rs28490139 ^R $\times 10^{-12}$ rs117483894 ^R $\times 10^{-8}$ rs2435907 ^P $\times 10^{-9}$	0,68 0,21	2,07%	sem comprometimento
P6	p.Leu218Arg ND	HET	S.I (PM2 PP3)	0,001% (2 0) ^ε	<i>OPAI</i> (*605290) CC1	ND	0,99 0,18	6,94%	5317794 ^a
P9	p.Ser568Thr ND	HET	NA	ausente	<i>SNX19</i> (NR) PX	ND	0,0 0,61	62,21%	ND
	p.Glu369Lys rs1263390525	HET	S.I (PM2 PP3)	0.0004% (1 0) ^ε	<i>FOXO1</i> (*136533) NA	ND	1,0 0,0	2,0%	3653873 ^c
P10	p.Pro295Arg rs1202800668	HET	S.I (PM2 BP4)	ausente	<i>CPE</i> (*114855) CP	ND	0,99 0,09	11,38%	3033164 ^b 3033165 ^b
P11	p.Cys80_Arg81delinsTrp rs756483193	HET	S.I (PM2 PM4)	ausente	<i>MST1</i> (*142408) KD	ND	0,0 0,77	62,36%	ND
	p.Leu8Gly rs7130187 + rs1292209992	HET	S.I (PM2)	0,0004% (1 0) ^ε	<i>COX8A</i> (*123870) ND	ND	0,12 0,67	54,98%	ND
P12	p.Arg473Gly ND	HET	S.I (PM2 PP3)	ausente	<i>KL</i> (*604824) KL1	rs57286125 ^P $\times 10^{-33}$ rs576674 ^R $\times 10^{-23}$ rs7983505 ^R $\times 10^{-18}$ rs67148051 ^R $\times 10^{-15}$ rs488166 ^R $\times 10^{-15}$ rs488321 ^P $\times 10^{-14}$ rs576674 ^R $\times 10^{-13}$	0,0 0,36	16,22%	2181617 ^b 3653638 ^b 3653640 ^b 3653641 ^a
P13	p.Asn106Ser rs774484457	HET	S.I (PM2 BP4)	0,0004% (1 0) ^ε	<i>KL</i> (*604824) KL1	=	0,0 0,36	16,22%	=
	p.Val256Met rs770085797	HET	S.I (PM2 PP3)	0,001% (3 0) ^ε	<i>RASGRF1</i> (*606600) DH	rs28582793 ^P $\times 10^{-7}$	1,0 0,11	48,53%	2669007 ^b

ID	Variante ID	Zigosidade	ACMG ¹	Frequência Alélica ² (HT HO)	Gene (OMIM) Região	GWAS ³ (alelo p)	pLI o/e - gnomAD ⁴	HI - DECIPHER ⁵	MGI - ID Genótipos ⁶ (pâncreas endócrino)
P14	p.Gly28Arg rs987741438	HET	S.I (PM2)	ausente	ZBED3 (*615250) C-T	rs7732130 ^R x10 ⁻³² rs6878122 ^R x10 ⁻²⁹ rs6885904 ^P x10 ⁻²⁰ rs4457053 ^R x10 ⁻¹⁸ rs6878122 ^R x10 ⁻¹¹ rs6885904 ^P x10 ⁻¹⁰ rs7708285 ^P x10 ⁻⁹ rs6453285 ^P x10 ⁻¹⁰	0,08 1,25	83,9%	ND
P15	p.Arg427Gln ND	HET	S.I (PM2)	ausente	PTPRD DF	rs17584499 ^R x10 ⁻¹⁰ rs10758950 ^P x10 ⁻⁹	1,0 0,05	0,14%	ND

¹Escala de patogenicidade do *The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP)* para variantes identificadas em genes com fenótipo OMIM: S.I - significado incerto; ²bases de dados genômico populacionais: ⁶gnomAD (v.2.1.1 / v.3.1.1) | ABraOM | GME - Variome | Iranome | ToMMO-4.7KJPN | GenomeAsia; ³GWAS *Catalog*: alelos com valor estatístico $p \leq 5 \times 10^{-8}$ ou limítrofe mapeados nos genes candidatos (R - risco | P - proteção); ⁴pLI - gnomAD (*probability of being loss-of-function intolerant*): $\geq 0,9$ - extremamente intolerante a variantes LoF; o/e - gnomAD (relação entre o número de variantes LoF observadas / número de variantes LoF esperadas): $<0,35$ - gene sob grande pressão seletiva para variantes LoF; ⁵HI - DECIPHER (*score de haploinsuficiência*): 0%-10% - grande probabilidade de haploinsuficiência; ⁶MGI - *Mouse Genome Informatics Database* - registros de genótipos em camundongos que cursaram com comprometimento estrutural/funcional de pâncreas endócrino: a) modelo com perda de função em heterozigose | b) modelo com perda de função em homozigose | c) modelo com ganho de função; ID: identificação; HET: heterozigoto; HO: homozigoto; TAD: domínio de transativação; AD-2: domínio de transativação 2; TM2: domínio transmembrana 2; CC1: super-hélice 1; PX: domínio *phox-homology*; CP: domínio carboxipeptidase; KD: domínio quinase; KL1: domínio homólogo extracelular KL1; DH: domínio de homologia Dbl; C-T: C-terminal; DF: domínio fibronectina III; NA: não aplicável; NR: não registrado; ND: não disponível.

Tabela 14 - Escala ClinGen de associação fenotípica de genes candidatos priorizados em estudo de exoma de probandos/famílias com diagnóstico clínico de MODY ou DMN

ID	Gene (OMIM)	Fenótipos Associados (# OMIM Monarch)	Modelo de Herança Mecanismo Molecular	ClinGen ¹ (Fenótipos Associados)	ClinGen (MODY DMN)
P2	<i>NOTCH1</i> (*190198)	Doença de Valva Aórtica (#109730) Síndrome de Adams-Oliver 5 (#616028)	Autossômico Dominante (E.V - P.I) Perda de Função (haploinsuficiência)	Forte ² Definitiva ³	Evidência não reportada
	<i>FOXC2</i> (*602402)	Síndrome de Linfedema-Distiquíase (#153400)	Autossômica Dominante (E.V - P.I 80-94%) Ganho de Função ou Perda de Função (haploinsuficiência)	Definitiva ⁴	
P3	<i>GPR39</i> (*602886)	NR	NR	NA	Evidência não reportada
P5	<i>TCF12</i> (*600480)	Craniosinostose 3 (#615314) Hipogonadismo Hipogonadotrófico (0018800) Atrofia Óptica Isolada/Sindrômica (#165500 #125250)	Autossômico Dominante/Recessiva Perda de Função (haploinsuficiência)	Definitiva ⁵ Limitada ⁶	Evidência não reportada
P6	<i>OPAI</i> (*605290)	Síndrome de Behr (#210000) Síndrome de Depleção Mitocondrial 14 (#616896)	Autossômico Dominante/Recessiva (E.V - P.I 43-100%) Perda de Função (<i>null</i> / haploinsuficiência)	Forte ⁷	Evidência não reportada
P9	<i>SNX19</i> (NR)	NR	NR	NA	Evidência não reportada
	<i>FOXO1</i> (*136533)	NR	NR	NA	Evidência não reportada
P10	<i>CPE</i> (*114855)	Comprometimento Intelectual e Hipogonadismo Hipogonadotrófico (#619326)	Autossômica Recessiva Perda de Função	Limitada ⁵	Evidência não reportada
P11	<i>MST1</i> (*142408)	NR	NR	NA	Evidência não reportada
	<i>COX8A</i> (*123870)	Síndrome de Leigh (#256000)	Autossômico Recessivo Perda de Função	Limitada ⁵	
P12	<i>KL</i> (*604824)	Calcinose Tumoral e Hiperfosfatemia Familiar tipo 3 (#617994)	Autossômica Recessiva Perda de Função	Limitada ⁸	Evidência não reportada
P13					
P13	<i>RASGRF1</i> (*606600)	NR	NR	NA	Evidência não reportada
P14	<i>ZBED3</i> (*615250)	NR	NR	NA	Evidência não reportada
P15	<i>PTPRD</i> (*601598)	NR	NR	NA	Evidência não reportada

¹Escala ClinGen de associação gene-fenótipo: Definitivo | Forte | Moderado | Limitado | Evidência não reportada | Evidências conflitantes; E.V - expressividade variável; P.I - penetrância incompleta; *The Gene Curation Coalition* (GenCC): ^{2,4}Gene2Phenotype (EMBL - *European Bioinformatics Institute*), ³Laboratory for Molecular Medicine (Broad Institute), ⁵ClinGen (Broad Institute), ⁶Franklin (Genoox), ⁷PanelApp (*Australian Genomics Health Alliance*), ⁸PanelApp (*Genomics England - NHS Genomic Medicine Service*); NA: não aplicável; NR: não registrado; ND: não disponível.

Tabela 15 - Novas associações gênicas em DMM identificadas após realização de estudo do exoma

Gene (OMIM)	Relato em DMM	Fenótipo	Herança	Abordagem de descoberta
<i>GATA6</i> (*601656)	2012 (113,114)	DMNP/DMNT/MODY	AD (frequentemente <i>de novo</i>)	Famílias Exoma
<i>STAT3</i> (*102582)	2014 (115,116)	DMN/DM autoimune	AD	Caso-Famílias-Coorte Exoma
<i>ZBTB20</i> (*606025)	2014 (117)	Síndrome de Primrose	AD (frequentemente <i>de novo</i>)	Famílias-Coorte Exoma
<i>LRBA</i> (*606453)	2017 (118)	DMNP	AR	Família Exoma
<i>EIF2S3</i> (*300161)	2018 (119,120)	Síndrome MEHMO	LXR	Famílias Exoma
<i>CNOT1</i> (*604917)	2019 (121,122)	Agenesia pancreática e holoprosencefalia	AD (<i>de novo</i>)	Famílias Exoma

DMM: Diabetes Mellitus Monogênico; DMNP: Diabetes Mellitus Neonatal Permanente; DMNT: Diabetes Mellitus Neonatal Transitório; MEHMO: mental retardation | epileptic seizures | hypogonadism | hypogenitalism | microcephaly | obesity; AD: autossômica dominante; AR: autossômica recessiva; LXR: ligada ao X recessiva.

Tabela 16 - Genes candidatos à associação com DMM priorizados após realização de estudo do exoma

Referência	Fenótipo Abordagem	Gene(s)	Percentual de descoberta
Shim <i>et al.</i> (2015) (107)	MODY Famílias	<i>PTPRD*</i> <i>SYT9</i>	40%
Çapan <i>et al.</i> (2020) (123)	MODY Famílias	<i>c-Myc</i> <i>CDK4</i> <i>ARHGDI1</i>	50%
Li <i>et al.</i> (2020) (124)	MODY Família	<i>IRS1</i>	NA
Cheon <i>et al.</i> (2020) (125)	DMM Coorte	<i>GCKR</i> <i>IRS1</i> <i>NPHP3</i>	21,4%
Song <i>et al.</i> (2020) (126)	MODY Família	<i>PIEZO1</i>	NA
Zhong <i>et al.</i> (2021) (127)	MODY Coorte	<i>FOXO1</i>	20%
Kim <i>et al.</i> (2021) (128)	DMNT Caso	<i>PIK3R1</i>	NA
Al-Fadhli <i>et al.</i> (2021) (129)	DMNP Caso	<i>PDIA6</i>	NA
Santana <i>et al.</i> (2021)	MODY-DMN Coorte-Família	<i>NOTCH1</i> <i>FOXC2</i> <i>GPR39</i> <i>TCF12</i> <i>OPAI1</i> <i>SNX19</i> <i>FOXO1</i> <i>CPE</i> <i>MST1</i> <i>COX8A</i> <i>KL</i> <i>RASGRF1</i> <i>ZBED3</i> <i>PTPRD</i>	68,7%

***Recorrência gênica identificada em nossa coorte; DMM: Diabetes Mellitus Monogênico; DMNP: Diabetes Mellitus Neonatal Permanente; DMNT: Diabetes Mellitus Neonatal Transitório.**

7.2.3 Probando P2 - MODY não GCK

No probando P2, um caso de MODY não *GCK* sem recorrência do DM em pais ou irmandade (**Figura 2**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou dois possíveis candidatos à associação fenotípica, *NOTCH1* (NM_017617.5 | éxon 34 | c.6910T>G | p.Leu2304Val) e *FOXC2* (NM_005251.3 | éxon 1 | c.1359G>A | p.Met453Ile).

O gene *NOTCH1* - *Notch Receptor 1* - (OMIM *190198 | pLI 1,0 | o/e 0,05 | HI 0,16) possui 34 éxons e 9.371pb em seu transcrito canônico (NM_017617.5) (**Figura 3**). Codifica uma proteína transmembrana de 2.555aa (NP_060087) integrante da família **NOTCH**, cujos membros compartilham um domínio extracelular com múltiplas repetições similares às do EGF (*epidermal growth factor*) e uma região intracelular com inúmeros domínios (130).

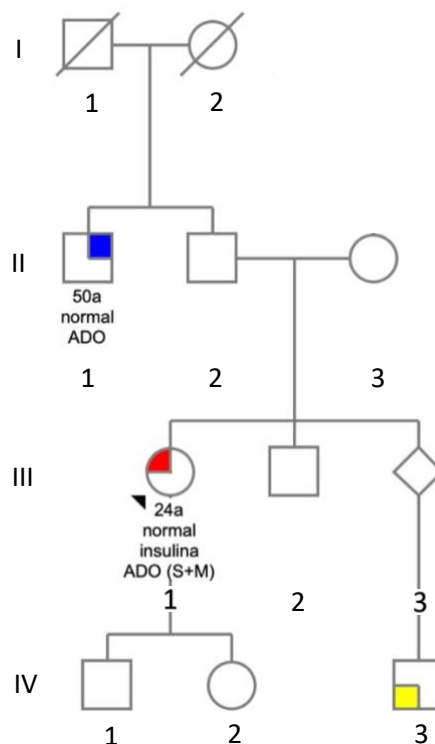


Figura 2 - Heredograma | Probando P2

Quadrado: gênero masculino; **círculo:** gênero feminino; **losango:** gênero desconhecido; **símbolo com linha diagonal:** falecido; **símbolos com preenchimento parcial:** azul (hiperglicêmico - DM2) | vermelho (hiperglicêmico - MODY) | amarelo (hiperglicêmico - IPEX | *Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, and Enteropathy, X-linked*); **símbolos sem preenchimento:** normoglicêmicos; **subtexto:** idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; **ADO:** antidiabético oral; **S:** sulfonilureia; **M:** metformina.

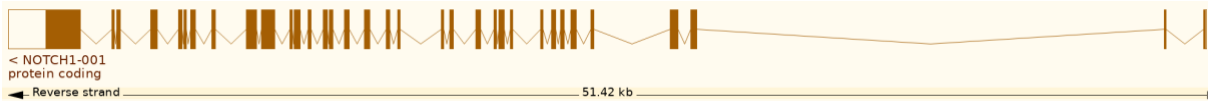


Figura 3 - Estrutura do gene *NOTCH1* - Transcrito NM_017617.5
Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

As proteínas NOTCH estão envolvidas em inúmeros processos de desenvolvimento celular, como diferenciação, proliferação e sobrevivência. Suas rotas intracelulares de sinalização são extremamente conservadas de forma evolutiva. A pré-proteína produzida sofre um processamento pós-traducional no complexo de Golgi, originando duas cadeias polipeptídicas que, heterodimerizadas, constituem o receptor de superfície celular (94,130).

O receptor NOTCH1 maduro é composto por uma extremidade N-terminal extracelular (NOTCH1-EC | aa 1-1.735) e uma subunidade C-terminal transmembrana (TM | aa 1.737-1.756) e intracelular (NOTCH1-IC | aa 1.757-2.555) (**Figura 4**). Sua porção EC alberga uma série de repetições similares às do EGF (aa 20-1426), responsáveis pela ligação ao ligante, além de três repetições denominadas LIM-12/NOTCH (aa 1449-1571) que estabilizam o domínio de heterodimerização (HD) e impedem a ativação do receptor na ausência de seus ligantes (132). A porção TM-IC, por sua vez, consiste de uma região transmembrana seguida por diferentes domínios citoplasmáticos que formam o domínio intracelular (ICD) (132,133).

Dentre os domínios localizados em ICD temos: domínio associado à RBPJ (*recombining binding protein suppressor of hairless*) (RAM); repetições ANK (anquirina) (aa 1.927-2.122); sinais de localização nuclear (NLS); domínio de transativação (TAD) e região C-terminal PEST (prolina | ácido glutâmico | serina | treonina) (132). A via Notch possui sua ativação condicionada à ligação ao receptor de proteínas das famílias SERRATE/JAGGED ou DELTAO, expressas por células adjacentes (132). O resíduo p.Leu2304, que alberga a variante identificada no probando P2, está localizado no domínio TAD.

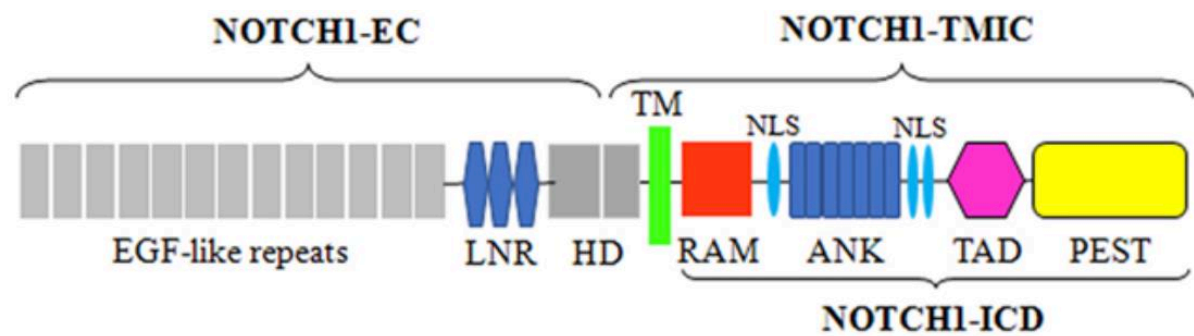


Figura 4 - Estrutura da proteína NOTCH1 madura

NOTCH1-EC: subunidade extracelular; NOTCH1-TMIC: subunidade transmembrana e intracelular; NOTCH1-ICD: domínio intracelular; LNR: repetições LIM-12/NOTCH; HD: domínio de heterodimerização; TM: porção transmembrana; RAM: domínio associado à RBPJ; NLS: sinais de localização nuclear; ANK: repetições anquirina; TAD: domínio de transativação; PEST: domínio C-terminal prolina | ácido glutâmico | serina | treonina (132).

Em relação ao tecido pancreático, estudos sugerem que esta via de sinalização seja responsável por bloquear a diferenciação do pâncreas endócrino. Tal efeito é resultante da inibição, temporal, de proteínas bHLH (*basic helix loop helix*), como o fator de transcrição NEUROD1 (134). NEUROD1 foi inicialmente descrito como um ativador do gene da insulina (135), com estudos posteriores (camundongos *knockout*) demonstrando sua importância na diferenciação e desenvolvimento pancreático (136). Tal fator de transcrição é atualmente causa documentada de DMNP (137) e MODY (138).

A ativação precoce da via Notch em estágios iniciais do desenvolvimento pancreático resultaria em uma maturação comprometida de suas porções endócrina e exócrina (139,140), sendo o tempo e o contexto da ativação fatores determinantes para seus efeitos sobre à organogênese e diferenciação (134).

Variantes inativadoras (*loss of function*) em heterozigose no gene *NOTCH1* estão associadas a um conjunto de doenças com comprometimento de valva aórtica (AD - OMIM #109730 | ClinGen MONDO:0019625) (141). Tais manifestações podem ser isoladas ou integrar uma condição síndrômica denominada Síndrome de Adams-Oliver (AD - OMIM #616028).

O repositório ClinVar possui registro de mais de 700 variantes não sinônimas pontuais (*missense*) em toda a extensão da proteína NOTCH1, incluindo o domínio TAD. A maioria destes alelos, presumidamente inativadores, foram reportados, associados a fenótipos cardiovasculares. O resíduo p.Leu2304 não possui nenhuma variante já reportada, fato este também confirmado por pesquisa ativa na literatura científica.

Os fenótipos já associados ao gene *NOTCH1*, sejam isolados ou sindrômicos, não possuem, classicamente, um comprometimento do pâncreas endócrino como uma de suas manifestações extravasculares. Vandersteen e Dixon (2011), entretanto, descreveram uma família (pai e duas filhas) com Síndrome de Adams-Oliver, cujo pai desenvolveu DM aos 20 anos de idade. Registros glicêmicos das filhas não estão disponíveis no manuscrito (142).

O probando P2 não possuía, no momento da avaliação, evidências clínicas que levassem à suspeita de doença valvar ou disgenesia pancreática (como insuficiência exócrina adicional à hiperglicemia (22)), nem mesmo histórico familiar destas afecções. Investigação ativa para detecção de alterações subclínicas, entretanto, não foram realizadas.

Estudo GWAS realizado em população japonesa com DM2 (143) identificou o alelo rs201053795 - *NOTCH1* como relacionado a valores elevados de glicemia de jejum ($p 3,43 \times 10^{-7}$ - limítrofe para o padrão $\leq 5 \times 10^{-8}$ de interpretação de significância). Além disso, OGMs (camundongos) com ativação condicional da via de sinalização cursaram com diversas alterações pancreáticas, sendo mais especificamente aquelas de pâncreas endócrino detalhadas a seguir:

1] Cepa C57BL/6

- Genótipo MGI:2684337: condicional | ativação da via de sinalização.
- Genótipo MGI:4436916: condicional | ativação da via de sinalização.

Fenótipo observado: comprometimento da morfologia do pâncreas endócrino, diminuição (100X) do número de células beta pancreáticas, desenvolvimento pancreático anormal, prejuízo na diferenciação das células progenitoras endócrinas (140).

2] Cepa C57BL/6

- Genótipo MGI:4943528: condicional | ativação da via de sinalização.
- Genótipo MGI:4943527: condicional | ativação da via de sinalização.
- Fenótipo observado: desenvolvimento pancreático anormal, bloqueio da diferenciação das células progenitoras da linhagem endócrina (144).

3] Cepa C57BL/6

- Genótipo MGI:5460865: condicional | ativação da via de sinalização.
- Fenótipo observado: comprometimento da morfologia da ilhota pancreática, ilhotas histologicamente indistinguíveis em comparação ao modelo

selvagem, camundongos reportados como normoglicêmicos, sem intolerância à glicose (134).

4] Cepa C57BL/6

- Genótipo MGI: 5460862: condicional | ativação da via de sinalização.
- Fenótipo observado: ausência de células secretando insulina, ausência de ilhotas pancreáticas, camundongos cursaram com hiperglicemia (134).

É importante destacar que *NOTCH1* apresenta o *score* máximo de probabilidade de intolerância à perda de função (pLI = 1), com uma probabilidade igualmente grande de ser haploinsuficiente (HI = 0,16), características compatíveis com o modelo de herança dominante observado nos fenótipos valvares já descritos. Desta forma, uma possível associação causal com manifestações de pâncreas endócrino, como aquelas observadas em MODY, seria condicionada por um ganho de função secundário à presença do alelo c.6910T>G | p.Leu2304Val no domínio TAD, resultando em uma ativação exacerbada e/ou atemporal da via Notch.

O segundo gene candidato, *FOXC2* - *Forkhead Box C2* - (OMIM *602402 | pLI 0,13 | o/e 0,3 | HI 5,65), possui um transcrito canônico de éxon único (NM_005251) com 1.683 pb (**Figura 5**) e um produto proteico de 501 aa (NP_005242). Pertencente a uma família de fatores de transcrição “*forkhead*”, compartilha com os outros membros um domínio de ligação ao DNA (*forkhead box*) extremamente conservado entre as espécies (145). Existem 17 subfamílias de genes FOX, nomeados de A-R, com > 40 integrantes já identificados na espécie humana, possuindo como funções já caracterizadas o controle do crescimento, proliferação, diferenciação e longevidade celular (146–148).

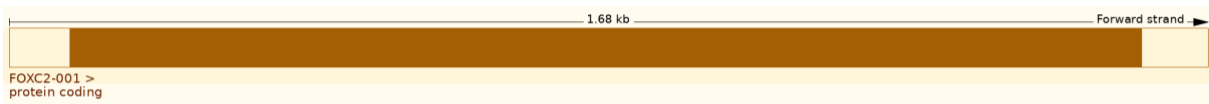


Figura 5 - Estrutura do gene *FOXC2* - Transcrito NM_005251

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region). Ensembl (131).

Com sua função específica ainda pouco caracterizada (149), o integrante *FOXC2* acumula evidências de ação na adipogênese (150), no desenvolvimento cardíaco (149) e renal (151) e na aquisição de capacidades metastáticas em células tumorais (152), possuindo a seguinte estrutura proteica (501 aa - NP_005242): 2 domínios de transativação (AD-1 | AD-2 -

aa 1-70 | 395-494); domínio *forkhead* de ligação ao DNA (FHD - aa 71-162), que contém o primeiro sinal de localização nuclear (NLS1 - aa 78-93); segundo sinal de sinalização nuclear (NLS2 - aa 168-176) e um domínio inibitório (ID-2 - aa 494-501) em sua extremidade C-terminal. Além disso, existem alguns sítios de fosforilação e SUMOnilação (regulação pós-traducional mediada pela proteína SUMO - *Small Ubiquitin-like Modifier*) em sua porção central (aa 163-394) (**Figura 6**) (153).



Figura 6 - Estrutura da proteína FOXC2 madura

AD-1 | AD-2: domínios de transativação; FHD: domínio *forkhead*; NLS: sinal de localização nuclear; ID-2: domínio inibitório; setas verdes: sítios de fosforilação; setas vermelhas: sítios de SUMOnilação (154).

Cederberg *et al.* (2001) demonstraram que níveis elevados de FOXC2, induzidos por uma dieta rica em gordura, parecem atuar como neutralizadores da maioria dos sintomas associados à obesidade, incluindo resistência insulínica, podendo ser considerados protetores contra o desenvolvimento de DM2 (150).

Dentre os fenótipos já associados ao *locus*, existe um quadro sindrômico denominado Síndrome de Linfedema-Distiquíase (AD - OMIM #153400), produto da ocorrência de variantes em heterozigose que culminam tanto na perda como no ganho de função proteica (153). Além das manifestações patognomônicas de comprometimento valvar (refluxo vascular superficial e, ou profundo de membros) e oftálmicas (distiquíase - fileira dupla de cílios), os indivíduos acometidos pela afecção podem cursar com doença renal e DM (155).

Menos de dez variantes pontuais não sinônimas (*missense*), não benignas/provavelmente benignas, já foram depositadas no ClinVar ao longo de toda a extensão da proteína FOXC2. Nenhuma delas, entretanto, ocorre no resíduo p.Met453 (domínio AD-2), algo também observado após busca ativa na literatura científica.

Esforços já foram dedicados à investigação e discussão da associação do gene **FOXC2** com desvios da normoglicemia. Pesquisadores identificaram evidências de correlação negativa entre sua expressão e valores elevados de glicemia de jejum (156) e positiva quanto à presença de um determinado alelo e concentrações séricas de peptídeo C (157). Outros trabalhos, entretanto, não foram capazes de observar relação entre **FOXC2** e disglucemia nos modelos de estudo propostos (158-162).

Yildirim-Torune *et al.* (2004) descreveram três pacientes com DM em uma família com Síndrome de Linfedema-Distiquíase, informação sobre idade ao diagnóstico da hiperglicemia estava presente em dois deles, sendo um aos 26 anos de idade (155).

De maneira similar às manifestações extrapancreáticas presentes nos fenótipos relacionados ao gene *NOTCH1*, o probando P2 não apresentou, em sua primeira avaliação, evidências clínicas que levassem à hipótese diagnóstica da Síndrome de Linfedema-Distiquíase. Investigação ativa de manifestações valvares e oftálmicas subclínicas, entretanto, não foram realizadas.

Estudos recentes têm demonstrado, em coortes com suspeita de DM de origem monogênica, um número crescente de pacientes com DM isolado, portadores de variantes em genes classicamente associados a apresentações sindrômicas do fenótipo (163,164).

A análise de cossegregação fenotípica dos alelos e a investigação ativa de manifestações subclínicas, daquelas reportadas nos fenótipos mendelianos associados a *NOTCH1* e *FOXC2*, auxiliarão em uma adequada interpretação dos resultados.

7.2.4 Probando P3 - MODY *GCK*

No probando P3, um caso de MODY *GCK* com uma marcante recorrência familiar do fenótipo (**Figura 7**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou um possível gene candidato à associação fenotípica, *GPR39* (NM_001508.3 | éxon 1 | c.216G>T | p.Met72Ile). A variante identificada é compartilhada por duas primas em 1º grau do probando (heredograma - III2 e III3) que possuem diagnóstico de DM antes dos 30 anos de idade.

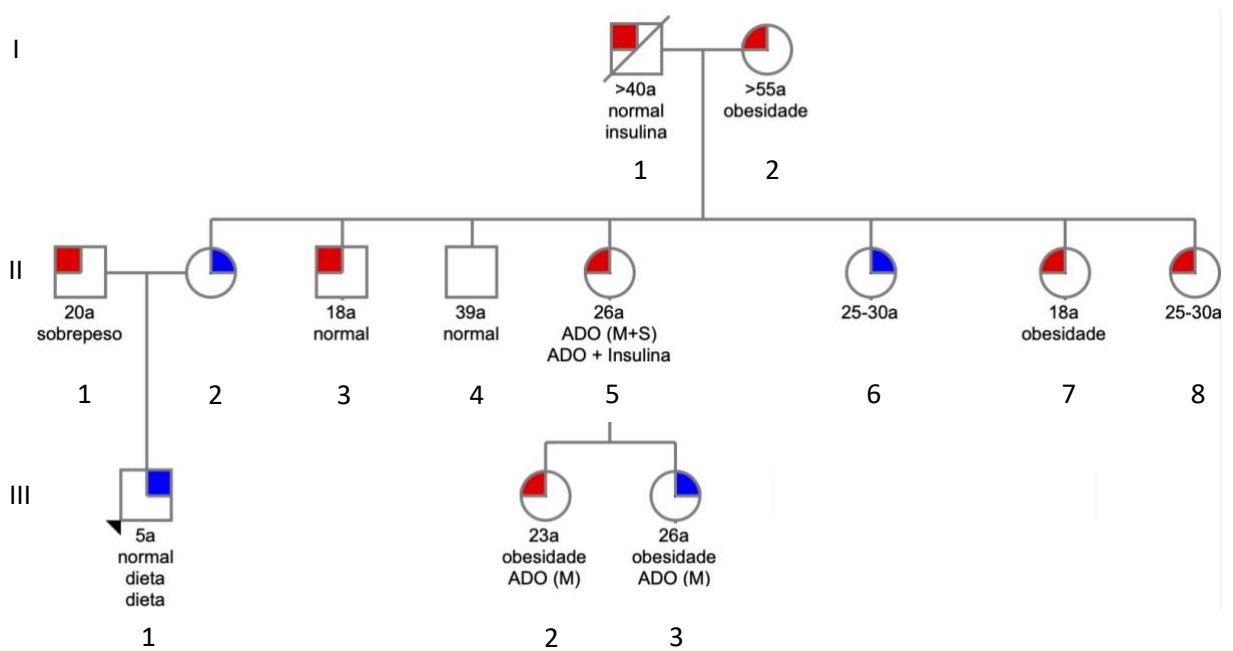


Figura 7 - Heredograma | Probando P3

Quadrado: gênero masculino; círculo: gênero feminino; símbolo com linha diagonal: falecido; símbolos com preenchimento parcial: azul (hiperglicêmico - pré-DM) | vermelho (hiperglicêmico - DM); símbolos sem preenchimento: normoglicêmicos; subtítulo: idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; ADO: antidiabético oral; M: metformina; S: sulfonilureia.

O gene **GPR39** - *G Protein-Coupled Receptor 39* - (OMIM *602886 | pLI 0,0 | o/e 1,2 | HI 51,56) codifica um receptor transmembrana membro da família de receptores de grelina cujo transcrito canônico (NM_001508.3) com 2.784 pb possui dois éxons e transcreve um polipeptídeo com 453 aa (**Figura 8**).

Inicialmente clonado em 1997, e com uma grande similaridade estrutural com o receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR), GPR39 transpassa a membrana celular sete vezes e pertence a um grande grupo de receptores acoplados à proteína G, integrando inúmeras rotas de sinalização nos mais diversos órgãos/tecidos: trato gastrointestinal, fígado, tecido adiposo e pâncreas endócrino (165,166).

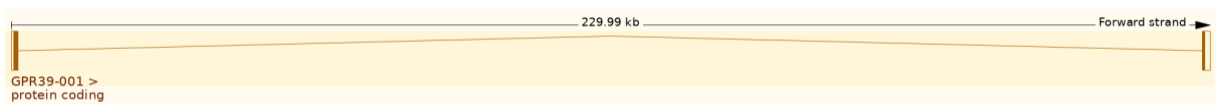


Figura 8 - Estrutura do gene **GPR39** - Transcrito NM_001508.3

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

O primeiro éxon de *GPR39* codifica os domínios transmembrana 1-5 (A) (TM1-5 | aa 1-285). Já o segundo éxon é responsável pelos 150 aa restantes, que constituem os domínios transmembrana 6 e 7 (B) (TM6-7 | aa 286-453) (167) (**Figura 9**).

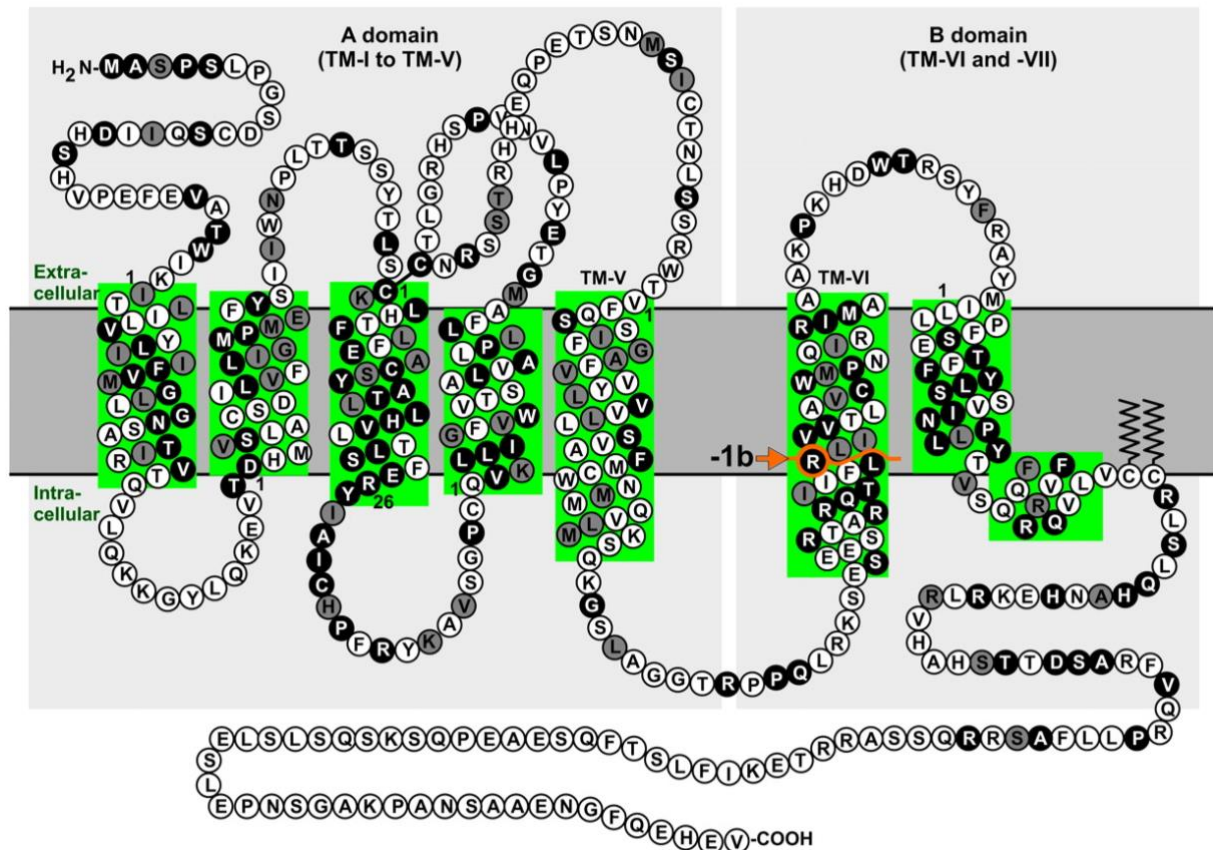


Figura 9 - Modelo serpentina da proteína GPR39

TM I-VII: domínios transmembrana 1-7; resíduos destacados em preto: extremamente conservados entre os membros da família de receptores de grelina; resíduos destacados em cinza: moderadamente conservados entre os membros da família de receptores de grelina; resíduos sem destaque: não conservados; linhas em zig-zag: sítio de palmitoilação; linha em negrito: ligação de dissulfeto; seta/linha laranja: localização da fronteira éxon/intron (166).

Com o intuito de melhor caracterizar o padrão de expressão de GPR39, inúmeros estudos foram conduzidos utilizando isolados celulares e, ou teciduais de diferentes espécies, incluindo humanos, roedores, pássaros e peixes, com o consenso de que o receptor é expresso principalmente em pâncreas, trato gastrointestinal, fígado e rins (167).

Já é bem documentado que a expressão de *GPR39* é regulada por dois fatores de transcrição, cuja perda de função é classicamente descrita como causa de DM monogênico: *HNF1A* (MODY *HNF1A*) e *HNF4A* (MODY *HNF4A*) (168). Análise mutacional com o comprometimento dos sítios de interação a estes fatores em região promotora de GPR39 culminou na redução de sua transcrição (166).

Assim como outros receptores acoplados à proteína G pertencentes à subfamília da grelina, GPR39 apresenta uma elevada atividade constitutiva (167). Inúmeros sítios de ligação ao Zn^{2+} já foram identificados ao longo de toda a sua estrutura, com função e importância cada vez mais exploradas e esclarecidas. Após a ligação a moléculas Zn^{2+} , GPR39 estimula, de maneira dose-dependente, o sistema fosfatidil-inositol-cálcio de segundo mensageiro, culminando em respostas fisiológicas que vão desde regulação do peso corporal, motilidade gastrointestinal e secreção hormonal (167,169).

Especificamente no tecido pancreático, GPR39 está presente tanto nas células β da porção endócrina como nos ductos da porção exócrina. Importantes descobertas quanto a sua função neste órgão foram realizadas em estudos *knockout*, utilizando OGM (168,170).

Holst *et al.* (2009), por exemplo, utilizaram camundongos *knockout* homocigotos para o ortólogo *Gpr39*, com o objetivo de avaliar sua relação com a homeostase glicêmica. Foram avaliados, mais especificamente, parâmetros como tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, arquitetura da ilhota pancreática, expressão gênica e secreção de insulina. Apesar do modelo animal utilizado ter apresentado sensibilidade à insulina normal, intolerância à glicose foi observada após administração oral e intravenosa de glicose, com diminuição da resposta hiperinsulinêmica esperada. Achados adicionais incluíam arquitetura de ilhota preservada com diminuição da expressão dos ortólogos *Pdx1* e *Hnf1a* (168).

Tremblay *et al.* (2009), por sua vez, reportaram secreção de insulina preservada em camundongos *Gpr39^{-/-}* entre 12 semanas-52 semanas de vida. Após este período, entretanto, ocorreu diminuição desta secreção, em relação ao modelo selvagem, após dieta rica em sucrose. Este achado foi atribuído, pelos pesquisadores, a uma redução secundária nos níveis de expressão de IRS-2 (*insulin receptor substrate 2*) nas células β pancreáticas (167).

Outros OGMs (camundongos) com comprometimento em homocigose do *locus* cursaram com alterações pancreáticas, sendo mais especificamente aquelas de pâncreas endócrino, detalhadas a seguir:

1] Cepa C57BL/6

- Genótipo: MGI: 3702556: homocigoto | *knockout*.
- Fenótipo: maior hiperglicemia pós-prandial em comparação a camundongos selvagens; hipoinsulinemia (redução relativa: 30-40%); aumento no tamanho/densidade das ilhotas pancreáticas pós-dieta rica em carboidratos (170); hiperglicemia e hiperinsulinemia moderadas (171).

Já é bem documentado que efeitos autócrinos são importantes para a manutenção da função pancreática. A insulina liberada pelas células β se liga a receptores presentes na superfície da própria célula. Este processo necessita da participação dos substratos IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) e IRS-2 (*insulin receptor substrate 2*), sendo extremamente importante para a regulação da secreção de insulina estimulada pela glicose, bem como para o desenvolvimento da célula β (167).

Além disso, sabe-se que existe um enriquecimento de íons Zn^{2+} nas vesículas de insulina e que ambas moléculas são secretadas no momento da exocitose (172). O influxo vesical dos íons Zn^{2+} é realizado pelo transportador ZnT8, que já possui um alelo de risco para DM2 mapeado em seu resíduo p.Trp325 (173) e cujo autoanticorpo (anti-ZnT8) foi identificado em 60%-80% dos casos com DM1 (174). Estes achados favorecem a hipótese de que o Zn^{2+} poderia contribuir com a sinalização autócrina e parácrina pancreática via GPR39 (167), entretanto detalhes mais específicos desta dinâmica são ainda pouco conhecidos.

GPR39 não possui, até o momento, quaisquer fenótipos monogênicos descritos nem alelos mapeados em estudos GWAS associados à homeostase glicêmica. O resíduo p.Met72, no qual a variante de P3 foi identificada, está localizado na porção inicial do domínio transmembrana 2.

Apesar da incompatibilidade de zigosidade dos OGMs *knockout*, com as manifestações relacionadas ao pâncreas endócrino reportadas apenas em homozigotos, o perfil glicêmico observado foi similar àquele existente no probando P3 e em suas primas (heredograma - III2 e III3), portadores do alelo candidato em heterozigose: caracteristicamente uma intolerância à glicose observada no TTOG com glicemia de jejum limítrofe.

É importante destacar o evidente fator metabólico de resistência insulínica existente nesta família, pela presença de inúmeros indivíduos diagnosticados com DM em um contexto de obesidade ou sobrepeso. Realizar uma análise de risco poligênico (*polygenic risk score*) auxiliaria na quantificação deste traço complexo que sabe-se possuir mais de cem *loci* responsáveis por aproximadamente 20% de sua herdabilidade (175). Isto não exclui, entretanto, a possibilidade de estarmos diante de uma sobreposição de fenótipos, com DM2 (poligênico) e MODY (monogênico), coexistindo ao longo das gerações e, até mesmo, em um único indivíduo, algo já observado e reportado (176).

Adicionalmente, análise de cossegregação do alelo candidato nos demais 19 familiares disponíveis auxiliarão uma melhor interpretação e discriminação do achado.

7.2.5 Probando P5 - MODY não *GCK*

No probando P5, um caso de MODY não *GCK* com recorrência familiar do fenótipo em irmão, pai e avô paterno (**Figura 10**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou um possível gene candidato à associação fenotípica, *TCF12* (NM_207037.1 | éxon 4 | c.191G>C | p.Gly64Ala).

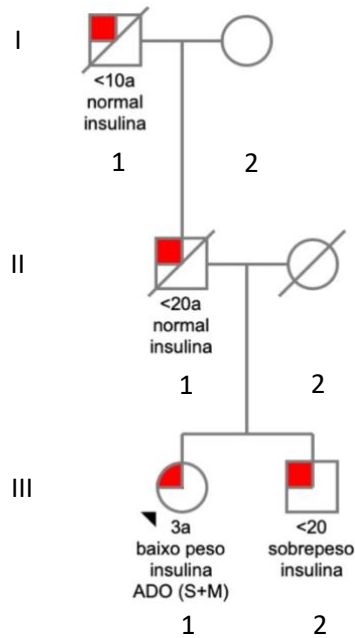


Figura 10 - Heredograma | Probando P5

Quadrado: gênero masculino; **círculo:** gênero feminino; **símbolo com linha diagonal:** falecido; **símbolos com preenchimento parcial:** vermelho (hiperglicêmico - DM); **símbolos sem preenchimento:** normoglicêmicos; **subtexto:** idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; **ADO:** antidiabético oral; **M:** metformina; **S:** sulfonilureia.

O gene *TCF12* - *Transcription Factor 12* - (OMIM *600480 | pLI 0,68 | o/e 0,21 | HI 2,07) codifica um membro da família de proteínas *helix-loop-helix* E (HLH) com 21 éxons em seu transcrito canônico (NM_207037.1), compreendendo 4.786 pb e 706 aa (**Figura 11**).

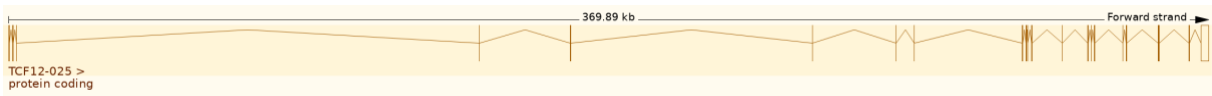


Figura 11 - Estrutura do gene *TCF12* - Transcrito NM_207037.1

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); **caixa vazia:** éxon (região não traduzida - UTR - *untranslated region*); **linha contínua:** íntron. Ensembl (131).

Expresso em inúmeros tecidos e com evidências de atuação sobre a regulação gênica linhagem específica (149), TCF12 possui quatro grandes domínios (a partir de sua extremidade N-terminal) (**Figura 12**): domínio de ativação 1 (AD1 - aa 109-160); domínio de ativação 2 (AD2 - aa 329-523); domínio REP (aa 540-573) e domínio *basic helix-loop-helix* (bHLH) (aa 599-655) próximo à extremidade C-terminal (177).



Figura 12 - Estrutura da proteína TCF12 (177)

A família de proteínas HLH é composta por inúmeros fatores de transcrição que atuam de maneira chave em uma variedade de processos biológicos, incluindo neurogênese, miogênese, hematopoiese e desenvolvimento pancreático. Tais proteínas interagem diretamente com *motifs* de hexanucleotídeos (CANNTG), denominados *E boxes*, localizados nas regiões promotoras e, ou *enhancers* dos genes-alvo (178).

Devido à grande quantidade de integrantes, as proteínas HLH podem ser classificadas de acordo com sua distribuição tecidual, capacidade de dimerização e especificidade de ligação ao DNA. TCF12, também conhecido com HEB, pertence à classe HLH 1. Os integrantes de HLH 1 possuem uma expressão ubíqua, sendo capazes de constituir homo ou heterodímeros. Sua especificidade de ligação ao DNA é limitada aos *motifs E boxes* (178).

Um importante número de genes cuja expressão é limitada ao tecido pancreático requer ligação a seus *motifs E boxes* para adequada transcrição. O gene da insulina, por exemplo, contém tais *motifs (E boxes E1 e E2)* de interação com proteínas HLH em sua região 5' flanqueadora (135). Estudo de mutagênese em camundongos demonstrou que especificamente o *motif E1* é essencial para a expressão tecido específica do gene da insulina, *motif* também existente na região promotora do respectivo ortólogo humano (179,180).

Para exercer sua função no pâncreas, TCF12 heterodimeriza com integrantes de HLH classe 2, como por exemplo BETA2. BETA2 é estrutural/funcionalmente idêntico ao NeuroD, fator relacionado à diferenciação neurogênica (178), ligante de *E boxes* em regiões promotoras e cujo ortólogo humano é causa documentada de diabetes *mellitus* neonatal permanente e MODY (OMIM #606394) (137,181).

OGM (camundongo) BETA2/NeuroD *knockout* homozigoto apresentou, além de um brando fenótipo neurológico, uma evidente malformação pancreática, hiperglicemia severa e morte prematura poucos dias após o nascimento (136). Modelo *knockout TCF12* homozigoto reportado no MGI, entretanto, não apresentou quaisquer manifestações funcionais e estruturais no pâncreas endócrino.

Adicionalmente, estudos GWAS já mapearam três alelos em *TCF12* em coortes com DM2 (GWAS *Catalog* GCST010557 | GCST009379 | GCST010555), todos com valor *p* estatístico $\leq 5 \times 10^{-8}$.

Com um modelo principal de patogênese molecular por haploinsuficiência (DECIPHER HI 2,06%) secundário a variantes LoF (gnomAD pLI 0,68), *TCF12* está associado a dois fenótipos monogênicos: craniosinostose 3 (AD - OMIM #615314) e hipogonadismo hipogonadotrófico (AD|AR - MONDO:0018800). Repositório ClinVar possui apenas cinco alelos não sinônimos (*missense*), não benignos/provavelmente benignos, depositados associados especificamente a craniosinostose, todos após o domínio AD1.

Variante identificada no probando P5 está localizada no resíduo p.Gly64, não reportada na literatura médico-científica e fora das regiões funcionais de *TCF12* até então caracterizadas. Curiosamente um alelo alternativo (G>A | p.Gly64Asp) foi mapeado, em heterozigose, em dois indivíduos (europeu não finlandês e afro-americano) na versão v.3.1.1 (hg38) do consórcio genômico-populacional gnomAD.

Probando P5 não apresentou, em avaliação clínica inicial, quaisquer afecções gonadais, ósseas ou neurológicas relacionadas aos fenótipos OMIM/MONDO de *TCF12* já descritos. Investigação ativa de manifestações subclínicas, entretanto, não foi realizada.

Com duas das três gerações reportadas com DM indisponíveis para a realização de estudo de cossegregação (falecimento dos respectivos aparentados - I1 e II1), a investigação e presença do alelo candidato na irmandade (heredograma - III2) não contribuiria para um fortalecimento significativo do grau de associação / patogenicidade. A ausência da variante em indivíduos normoglicêmicos da família e a identificação de um segundo probando portador de alelo candidato em *TCF12*, utilizando a plataforma GeneMatcher (182) por exemplo, poderia auxiliar melhor interpretação do achado, em curto prazo.

7.2.6 Probando P6 - MODY não GCK

No probando P6, um caso de MODY não *GCK* com recorrência do fenótipo em pai, avô materno, tia materna e primos em primeiro grau (**Figura 13**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou um possível gene candidato à associação fenotípica, *OPAI* (NM_015560.2| éxon 6 | c.653T>G | p.Leu218Arg).

O gene *OPAI* - *OPAI Mitochondrial Dynamin Like GTPase* - (OMIM *605290 | pLI 0,99 | o/e 0,18 | HI 6,94) codifica uma proteína com oito isoformas, expressa de maneira variável em diferentes tecidos humanos, sendo aquela com retenção do éxon 4 (pós-processamento do pré-RNA) a mais abundante (183). O produto de seu transcrito canônico (NM_015560.2) possui 29 éxons e 6.340 pb (**Figura 14**) que codificam um peptídeo de 960 aa (NP_056375), constituído por: sequência de sinalização mitocondrial (MIS | aa 1-87) em região N-terminal, três domínios transmembrana (TM1-TM2a-TM2b | aa 97-113 e aa 149-209), duas super-hélices (CC0-CC1 | aa 210-254), domínio GTPase (aa 280-520) e domínio efetor de GTPase (GED) em uma terceira super-hélice (CC2) (aa 895-960), localizados na extremidade C-terminal (183,184) (**Figura 15**).

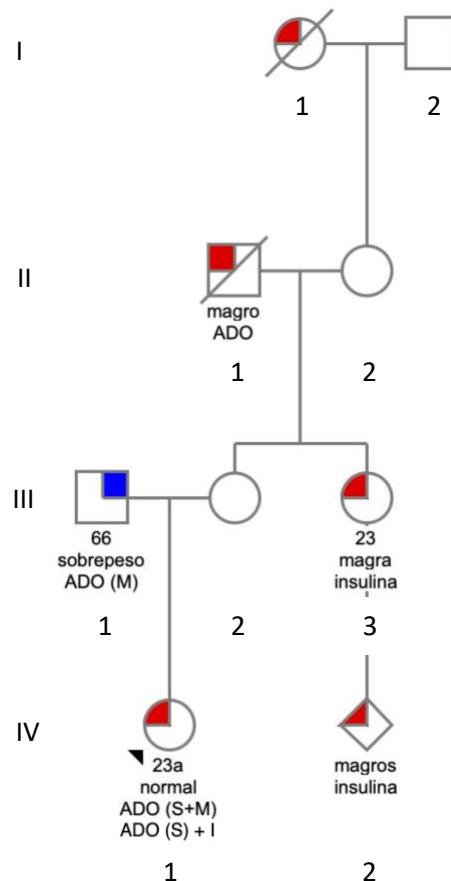


Figura 13 - Heredograma | Probando P6

Quadrado: gênero masculino; círculo: gênero feminino; losango: gênero desconhecido; símbolo com linha diagonal: falecido; símbolos com preenchimento parcial: azul (hiperglicêmico - pré-DM) | vermelho (hiperglicêmico - DM / MODY); símbolos sem preenchimento: normoglicêmicos; subteto: idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; ADO: antidiabético oral; S: sulfonilureia; M: metformina; I: insulina.

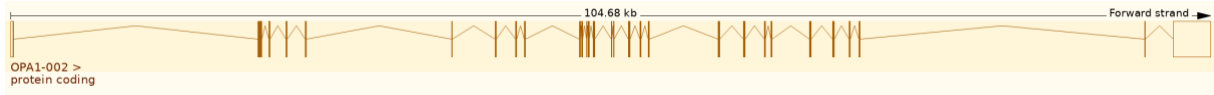


Figura 14 - Estrutura do gene *OPA1* - Transcrito NM_015560.2

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - *untranslated region*); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

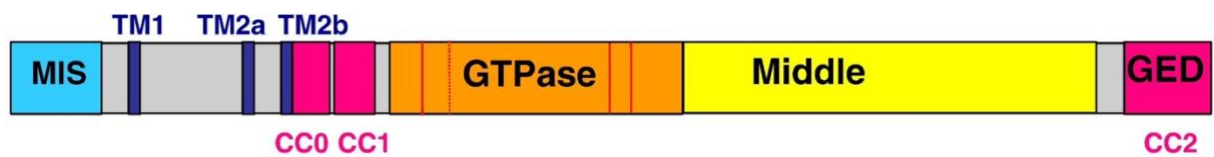


Figura 15 - Estrutura da proteína *OPA1*

MIS: sequência de sinalização mitocondrial; TM1-TM2a-TM2b: domínios transmembrana; CC0-CC1-CC2: super-hélices; GED: domínio GTPase efetor (185).

Após a importação de *OPA1* para a membrana mitocondrial, um processo de clivagem mediada por peptidases mitocondriais (MPP) é responsável por originar uma forma longa (*OPA1-L*), transmembrana-ancorada, ou uma forma curta solúvel (*OPA1-S*). Esta última permanece fixada periféricamente à membrana mitocondrial interna ou difusa no espaço intermembranas (183).

Funcionalmente *OPA-1* atua direta e indiretamente em diversos processos mitocondriais, como regulação da estabilidade e produção energética, manutenção da morfologia, fissão e fusão da organela (149,183).

Variantes monoalélicas (heterozigose) ou bialélicas (heterozigose composta / homozigose) em *OPA1* que culminem em perda de sua função são causas já documentadas de fenótipos neurodegenerativos que cursam com atrofia óptica isolada ou sindrômica. Esta última ocorrendo frequentemente associada a afecções como surdez, miopia, ataxia ou neuropatia e, mais raramente, DM (AD|AR - OMIM #165500 | #125250 | #210000 | #606657 | #616896).

Mais de cem variantes pontuais não sinônimas (*missense*), não benignas/provavelmente benignas, já foram depositadas no ClinVar ao longo de todo gene *OPA1*, a maioria localizada nos domínios GTPase. O alelo c.653T>G | p.Leu218Arg, identificado no probando P6, está localizado na super-hélice CC1 que alberga variantes já

descritas, associadas à atrofia óptica (186). Nenhuma, entretanto, ocorre no resíduo p.Leu218, algo confirmado após busca ativa na literatura científica.

OGM (camundongo) com comprometimento do *locus* cursou com alterações de função pancreática, sendo mais especificamente aquelas de pâncreas endócrino detalhadas a seguir:

1] Cepa C57BL/6

- Genótipo MGI:5317794: condicional | depleção de OPA1 (~90%).
- Fenótipo observado: diminuição na secreção de insulina; hiperglicemia; diminuição do consumo energético das ilhotas em resposta à glicose; intolerância à glicose; diminuição do número, tamanho, densidade e proliferação de células beta pancreáticas; diminuição de ilhotas e células beta com comprometimento na produção de ATP-glicose-dependente; comprometimento da morfologia e função mitocondriais. Adicionalmente, o modelo apresentava células beta com uma preservação da secreção de insulina não estimulada e da apoptose (187).

A literatura médico-científica recomenda que o comprometimento do gene *OPAI* deva ser considerado quando no diagnóstico diferencial de apresentações atípicas da Síndrome de Wolfram (AR - OMIM #222300) (188,189), um quadro bem documentado de diabetes monogênico sindrômico que cursa classicamente com diabetes *insipidus*, DM, surdez e atrofia do nervo óptico. Variantes em homozigose ou heterozigose composta no gene *WFS1* são as responsáveis pelo fenótipo observado. Mais recentemente, entretanto, pacientes heterozigotos com DM isolado (não sindrômico) foram reportados em um modelo, presumivelmente, dominante negativo de herança mendeliana (164).

É importante destacarmos, também, que *OPAI* atua primariamente na manutenção da fisiologia mitocondrial, organela classicamente associada a um quadro sindrômico de DM (MIDD - *Maternally Inherited Diabetes-Deafness*), que cursa com hipoacusia neurosensorial e, ou oftalmoplegia (OMIM # 520000) (20). De maneira similar ao *WFS1*, variantes mitocondriais têm sido recentemente identificadas em casos com hiperglicemia isolada, incluindo a troca m.3243A>G (MT-TL1:n.14A>G) (164), causa historicamente documentada não apenas de MIDD como também de apresentação sindrômica mais grave, como MELAS (*Myopathy | Encephalopathy | Lactic acidosis | Stroke*) (20).

Além do DM em idade jovem, probando P6 possui diagnóstico recente de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). DRGE é uma afecção digestiva relativamente comum entre adultos (190), sendo caracterizada por um refluxo esofágico do conteúdo estomacal. Possui como principal causa um comprometimento do esfíncter esofágico inferior, mais especificamente um relaxamento independente de deglutição (191). Manifestações gastrointestinais já foram observadas em quadros sindrômicos associados a **OPAI**, como dismotilidade, disfagia e dificuldade para mastigar e, ou sugar (192–194). Como já sugerido em outras mitocondriopatias, tais manifestações seriam decorrentes de uma miopatia mitocondrial visceral ou de uma neuropatia autonômica (194).

Em relação à presença de manifestações extrapancreáticas, probando P6 possui acuidade visual preservada (atestado em avaliação oftálmica) e sem queixas de comprometimento auditivo (exame de audiometria não realizado). Investigação quanto à presença familiar das referidas afecções, entretanto, não foi ativamente realizada.

O achado molecular em **OPAI** aqui reportado poderia caracterizar uma apresentação atípica da já documentada Atrofia Óptica Autosômica Dominante com ou sem surdez e diabetes (OMIM #125250 | MONDO:0008134), algo que corroboraria o grande espectro de manifestações clínicas observado nas mitocondriopatias. Além disso, é importante destacar a identificação de um alelo (NM_015560.2 - c.653T>G | p.Leu218Arg) com REVEL > 0,7 em um gene haploinsuficiente (HI 6,94) e intolerante à perda de função (pLI 0,99 | o/e 0,18), características compatíveis com o modelo de herança dominante já descrito.

7.2.7 Probando P9 - MODY não *GCK*

No probando P9, um caso de MODY não *GCK* com recorrência do fenótipo de DM em mãe e irmandade (**Figura 16**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou dois possíveis genes candidatos à associação fenotípica, ***SNX19*** (NM_014758.2 | éxon 2 | c.1703G>C | p.Ser568Thr) e ***FOXO1*** (NM_002015.4 | éxon 2 | c.1105G>A | p.Glu369Lys).

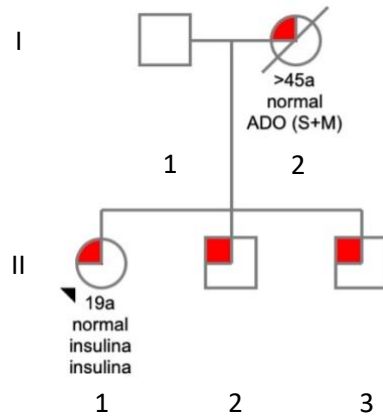


Figura 16 - Heredograma | Probando P9

Quadrado: gênero masculino; círculo: gênero feminino; símbolo com linha diagonal: falecido; símbolos com preenchimento parcial: vermelho (hiperglicêmico - DM); símbolo sem preenchimento: normoglicêmico; subtítulo: idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; ADO: antidiabético oral; S: sulfonilureia; M: metformina.

O gene *SNX19* - *Sorting Nexin 19* - (não OMIM | pLI 0 | o/e 0,61 | HI 62,21) possui um transcrito canônico (NM_014758.2) com 6.535 pb que codifica um produto (NP_055573) com 992 aa (Figura 17).

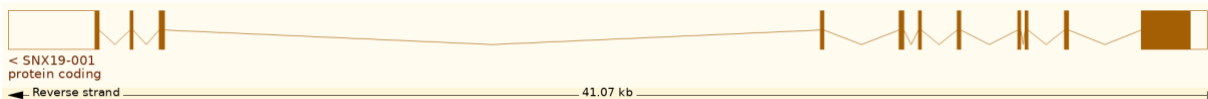


Figura 17 - Estrutura do gene *SNX19* - Transcrito NM_014758.2

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - *untranslated region*); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

A subfamília de *sorting nexins* pertence à superfamília de proteínas SNX, e ambas possuem como característica comum a presença do domínio *phox-homology* (PX). Apresentam uma grande versatilidade funcional, desempenhando papéis essenciais na sinalização celular, remodelamento da membrana plasmática, motilidade de organelas e no tráfego transmembrana (195).

SNX19 integra, especificamente, uma subfamília denominada PXA-RGS-PX-PXC e estruturalmente possui, a partir de sua extremidade N-terminal, um domínio transmembrana integrado (IMD); seguido pelos domínios *phox-homology* (PX | aa 494-676); *C-terminal* PX (PXC) e *PX-associated* (PXA) (Figura 18) (195).



Figura 18 - Estrutura da proteína SNX19

IMD: domínio transmembrana integrado; PX: domínio *phox-homology*; PXC: domínio C-terminal PX; PXA: domínio PX-associated (195).

O domínio PX, no qual alelo candidato p.Ser568Thr foi identificado no probando P9, é responsável pela ligação à membrana plasmática, via fosfatidilinositol, de organelas provenientes do sistema secretório e endocítico. SNX19 possui como principal ligante já identificado o autoantígeno IA-2 (*islet antigen-2*) (196).

IA-2 é um dos mais importantes autoantígenos na patogênese molecular do DM1, sendo um membro enzimaticamente inativo da família de proteínas transmembrana tirosina fosfatase (PTP). Localizado nas vesículas secretórias densas (*Dense-Core Secretory Vesicles - DCV*), possui importante participação na regulação da secreção de insulina (196).

A interação entre SNX19 e IA-2 nas DCV ocorre por intermédio do domínio PX, culminando em um bloqueio da degradação intracelular prematura das moléculas de insulina. Sabe-se que os integrantes da família proteica SNX participam da endocitose de receptores de membrana plasmática e do tráfego proteico entre compartimentos celulares, sendo então possível que IA-2 module o tráfego de DCV, bem como a secreção de seu conteúdo, por meio de sua interação com SNX19 (169,196).

De fato, *knockdown* de *Snx19* em linhagem de células β pancreática (MIN6) de camundongos resultou em uma diminuição nas concentrações de IA-2, no número (~75%) e tamanho (~40%) das DCV, além de redução no conteúdo vesical de insulina. Tais eventos se correlacionaram positivamente a um aumento da atividade autofágica lisossomal e diminuição da secreção do respectivo hormônio. Quando SNX19 foi reintroduzido nas células em *knockdown*, em um modelo de recuperação, ocorreu um restabelecimento do conteúdo de insulina, de sua secreção e do tamanho e número das DCV. Os autores concluíram, então, que SNX19, a partir de sua ligação a IA-2, seria responsável por estabilizar as DVC, bem como seu conteúdo, em células β pancreáticas (197).

Olsson A. H. *et al.* (2014) silenciaram a expressão de *Snx19* em linhagem clonal de células β , o que afetou sua proliferação e, curiosamente, culminou em um aumento no número de células (198). É sabido que tal membro da família SNX é capaz de preservar a célula β em um estado pré-apoptótico em decorrência de sua interação com IA-2 (199).

Não existe, até o momento, descrição de quaisquer fenótipos monogênicos relacionados ao comprometimento da função de *SNX19*. De maneira oposta ao esperado após estudos de *knockdown* em linhagens MIN6, OGMs *knockout* (camundongos) depositados no MGI não apresentam comprometimento de pâncreas endócrino.

Alelos no/próximos ao gene *SNX19* já foram mapeados em uma análise de enriquecimento pós-estudo de ligação em uma coorte ameríndia com DM2, com uma grandeza de valores *p* da ordem de 10^{-3} (200).

As evidências existentes, mesmo que ainda limitadas e, em determinados aspectos, conflitantes, demonstram a importância de *SNX19* na função secretora da célula β pancreática e, conseqüentemente, na manutenção da homeostase glicêmica.

O segundo gene candidato, *FOXO1 - Forkhead Box O1* - (OMIM *136533 | pLI 1,0 | o/e 0,0 | HI 2,0), assim como o *FOXC2* observado no probando P2, pertence a uma família de fatores de transcrição *forkhead*. Com 5.735 pb em seu transcrito canônico (NM_002015.4) (**Figura 19**) e um produto proteico de 655 aa (NP_002006), possui uma função ainda pouco caracterizada, com evidências sugerindo uma atuação no crescimento miogênico, na diferenciação celular (149) e homeostase glicêmica (201).



Figura 19 - Estrutura do gene *FOXO1* - Transcrito NM_002015.4

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

Estruturalmente a proteína FOXO1 é constituída, a partir de sua extremidade N-terminal, por uma região conservada (CR1 | aa 8-32); seguida pelo domínio *forkhead* (FD | aa 155-259); sinal de localização nuclear (NLS | aa 245-274); sinal de exportação nuclear (NES | aa 371-380) e, por fim, um domínio de transativação (TAD | aa 601-634) em C-terminal (202). Alelo candidato p.Glu369Lys identificado no probando P9 está localizado em resíduo fora dos domínios de FOXO1, já caracterizados funcionalmente (**Figura 20**).



Figura 20 - Estrutura da proteína FOXO1

CR1: região conservada; FD: domínio *forkhead*; NLS: sinal de localização nuclear; NES: sinal de exportação nuclear; TAD: domínio de transativação; P: resíduos de fosforilação por proteína quinase B (PKB) (203).

Algo comum aos membros da família FOX (*forkhead box*) de fatores de transcrição é a presença de um domínio de ligação ao DNA extremamente conservado, denominado *forkhead*. Este domínio é constituído por 3 alfa-hélices (H1-H3), além de outras estruturas secundárias como 3 folhas β (S1-S3) e 2 *loops* (W1 e W3) (203).

Em comparação às demais subclasses de FOX, os domínios das proteínas FOXO contêm uma inserção de 5 aa entre as alfa-hélices H2 e H3. O domínio *forkhead* de todos os integrantes da subclasse O (*others*) reconhecem, no DNA, duas sequências consenso, denominadas DBE (DAF-16 *family member-binding element*) e IRE (*insulin responsive element*) (203,204).

FOXO1 e os outros três membros da subclasse “O” participam de inúmeros processos de manutenção da homeostasia celular, como ciclo de replicação, longevidade, resposta e resistência ao estresse, reparo de danos ao DNA, apoptose, resistência tumoral e metabolismo (203).

É sabido que um dos mecanismos pelo qual a insulina modula o controle glicêmico é por meio da expressão gênica. Tal controle ocorre devido à realização de modificações na ligação e na atividade de fatores de transcrição, como FOXO1, aos IREs. Especificamente em relação a este, evidências sugerem uma contribuição para supressão da expressão gênica mediada pela insulina. FOXO1 funcionaria, então, predominantemente como um antagonista da insulina e um fator pró-DM (205,206).

Alterações no metabolismo da glicose já foram creditadas a uma estabilidade comprometida de FOXO1. Além disso, interações de tal proteína com o fator de transcrição HNF4 (*hepatocyte nuclear factor-4*) demonstram uma inserção no contexto da expressão gênica regulada pela insulina, sendo HNF4 conhecido por importante atuação no tecido pancreático e na regulação da glicose e metabolismo lipídico no fígado, além de causa bem documentada de MODY (AD - OMIM #125850). Diante disto, acredita-se que as interações com FOXO1 poderiam modular/influenciar algumas destas funções (203).

Inúmeros modelos animais já foram utilizados com o intuito de explorar, *in vivo*, as funções das proteínas FOXO. A ativação constitutiva de FOXO1, por exemplo, resultou em uma intolerância à glicose devido à potencialização da gliconeogênese hepática e disfunção de célula β (203,207,208). A regulação da gliconeogênese hepática por FOXO1 ocorre especificamente por ação deste na expressão gênica da glicose-6-fosfatase (209).

De maneira oposta, a haploinsuficiência de **FOXO1** está relacionada à melhora na sensibilidade à insulina e proteção contra o fenótipo hiperglicêmico, resultado de diminuição

na expressão de genes gliconeogênicos no tecido hepático e aumento na expressão de “genes de sensibilidade à insulina” no tecido adiposo (209).

Tal efeito inibitório é mediado pela ação de PKB, resultando em fosforilação de FOXO1 e consequente exclusão nuclear. Tal translocação está positivamente relacionada à indução da expressão do gene *PDX1*, regulador chave no desenvolvimento pancreático (209) e causa já documentada de diabetes monogênico (AD - OMIM #606392). Os fatores de transcrição FOXO1 e PDX1 possuem um padrão de localização nuclear, na célula β pancreática, mutuamente excludentes, com o primeiro atuando como repressor da expressão de *PDX1* via inibição da ligação de FOXA2 à região promotora deste (210).

O comprometimento da função do gene não foi reportado, ainda, a nenhuma condição humana monogênica, tendo sido descritas apenas alterações somáticas relacionadas a rabdomyosarcoma (OMIM #268220). Adicionalmente, entretanto, estudo de enriquecimento de variantes alélicas comuns no gene *FOXO1* em uma coorte europeia de indivíduos com DM2, ou normoglicêmicos com risco aumentado para seu desenvolvimento, demonstrou uma relação destes alelos com a secreção de insulina e intolerância à glicose (209).

Como já mencionado, OGM (camundongo) com alelo *FOXO1* de ganho de função cursou com alterações pancreáticas, sendo mais especificamente aquelas de pâncreas endócrino detalhadas a seguir:

1] Cepa: híbrido FVB | C57BL/6

- Genótipo MGI: 3653873: transgene | superexpressão.
- Fenótipo observado: hiperglicemia de jejum; diminuição de insulinemia pós-alimentação; intolerância à glicose e resistência insulínica (207).

Todas as evidências existentes, e em parte aqui discutidas, sugerem que uma possível causa monogênica de DM relacionada a *FOXO1* necessitaria ser condicionada por um mecanismo de ganho de função, diferentemente da haploinsuficiência ou citotoxicidade em geral comumente observada nos subtipos de DMM já descritos (35).

Diante destas informações, a investigação da recorrência de ambos os alelos candidatos na irmandade afetada (heredograma - II2 e II3) se faz necessária para o fortalecimento, ou não, da hipótese causal de associação.

7.2.8 Probando P10 - MODY *GCK*

No probando P10, um caso de MODY *GCK* com recorrência do fenótipo em pai, avó paterna e tio paterno (**Figura 21**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou um possível gene candidato à associação fenotípica, *CPE* (NM_001873.4 | éxon 5 | c.884C>G | p.Pro295Arg).

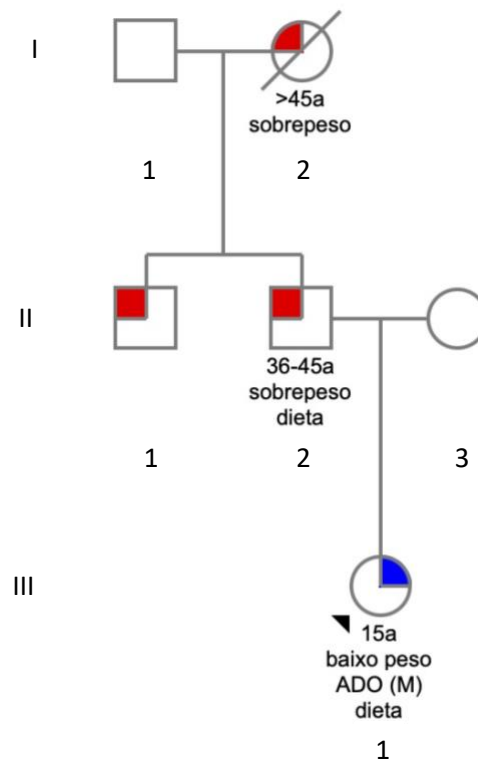


Figura 21 - Heredograma | Probando P10

Quadrado: gênero masculino; **círculo:** gênero feminino; **símbolo com linha diagonal:** falecido; **símbolos com preenchimento parcial:** azul (hiperglicêmico - pré-DM) | vermelho (hiperglicêmico - DM); **símbolo sem preenchimento:** normoglicêmico; **subtexto:** idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; **ADO:** antidiabético oral; **M:** metformina.

O gene *CPE* - *Carboxypeptidase E* - (OMIM *114855 | pLI 0,99 | o/e 0,09 | HI 11,38) pertence a uma família de metalocarboxipeptidases que inclui inúmeras carboxipeptidases regulatórias, digestivas, pancreática e plasmática (211). Possui um transcrito canônico (NM_001873.4) com 2.421 pb (**Figura 22**) e um produto proteico (NP_001864) com 476 aa.

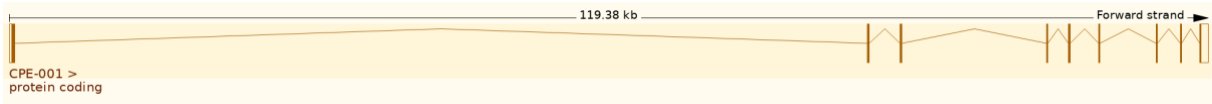


Figura 22 - Estrutura do gene *CPE* - Transcrito NM_001873.4

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

CPE é a mais importante carboxipeptidase envolvida na biossíntese de inúmeros peptídeos hormonais e neurotransmissores associados ao controle do equilíbrio energético e saciedade. Dentre os pró-hormônios processados por CPE podemos citar o da pró-insulina (211).

Localizada nos grânulos secretórios das células endócrinas e neuroendócrinas, CPE coexiste em uma forma solúvel e acoplada à membrana plasmática. A forma solúvel atua como uma endopeptidase, clivando e produzindo hormônios biologicamente ativos. As moléculas acopladas à membrana, entretanto, funcionam como receptores de pró-hormônios e pró-neuropeptídeos que regulam vias de secreção (212).

CPE é transcrita como uma proteína precursora (**Figura 23**), sendo submetida a inúmeras modificações pós-traducionais. Pré-pró-CPE, como é denominada, possui, a partir de sua extremidade N-terminal, um peptídeo sinal hidrofóbico (SP | aa 1-26); um peptídeo de ativação (P | aa 27-43); domínio carboxipeptidase (CP | aa 44-450); e um domínio α -hélice anfipático adjacente a uma cauda citoplasmática em C-terminal (aa 451-476) (212,213).



Figura 23 - Estrutura da proteína precursora Pré-Pró-CPE

Segmentos em destaque: SP (roxo - peptídeo sinal); P (laranja - peptídeo de ativação); CP (azul - domínio carboxipeptidase); α -hélice (verde); cauda citoplasmática (cinza) (212).

Após a tradução de pré-pro-CPE, seu peptídeo sinal é clivado e a estrutura restante transportada ao retículo endoplasmático e, posteriormente, ao complexo de Golgi, local em que endoproteases realizarão a remoção do peptídeo de ativação. Já nos grânulos de secreção, CPE agora maduro, pode se fixar à membrana ou permanecer solúvel após clivagem da α -hélice e da cauda citoplasmática (**Figura 24**).

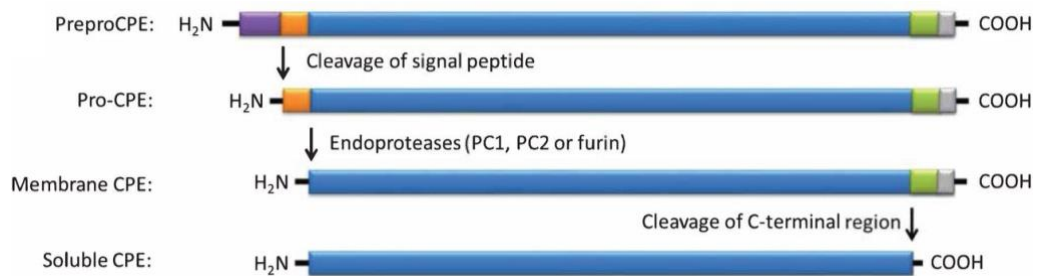


Figura 24 - Processamento pós-traducional de Pró-CPE (213)

O polipeptídeo pré-pró-CPE recém traduzido é submetido a uma série de modificações pós-traducionais: 1) clivagem do peptídeo sinal (N-terminal); 2) remoção, via endoproteases, do peptídeo de ativação (N-terminal); 3) clivagem do complexo α -hélice-cauda citoplasmática (C-terminal).

A biossíntese da insulina, que possui seu pró-hormônio processado por CPE solúvel, é iniciada pela tradução de uma molécula precursora denominada pré-pró-insulina. Pré-pró-insulina é um polipeptídeo constituído, a partir de sua extremidade N-terminal, por um peptídeo sinal (PS), seguido por uma cadeia B que se conecta a uma cadeia A por meio do peptídeo C (214).

De maneira sucinta, o peptídeo sinal condiciona a transferência da pré-pró-insulina para o RE, local em que PS será enzimaticamente removido, dando origem à pró-insulina. A molécula convertida é então transferida, através do complexo de Golgi, para grânulos de secreção nos quais a clivagem do peptídeo C é realizada e a molécula de insulina madura, obtida. A insulina pós-processamento, constituída apenas das cadeias A e B, permanece armazenada em tais vesículas secretórias até que sua fusão à membrana plasmática permita sua exocitose (214).

A carboxipeptidase CPE, em sua forma solúvel, participa da etapa de clivagem da cadeia B em sua extremidade C-terminal, mais especificamente com a remoção dos resíduos Arg55-Arg56 (**Figura 25**). Desta forma, apresenta papel essencial no processo de conversão da molécula de pró-insulina na molécula de insulina madura (214).

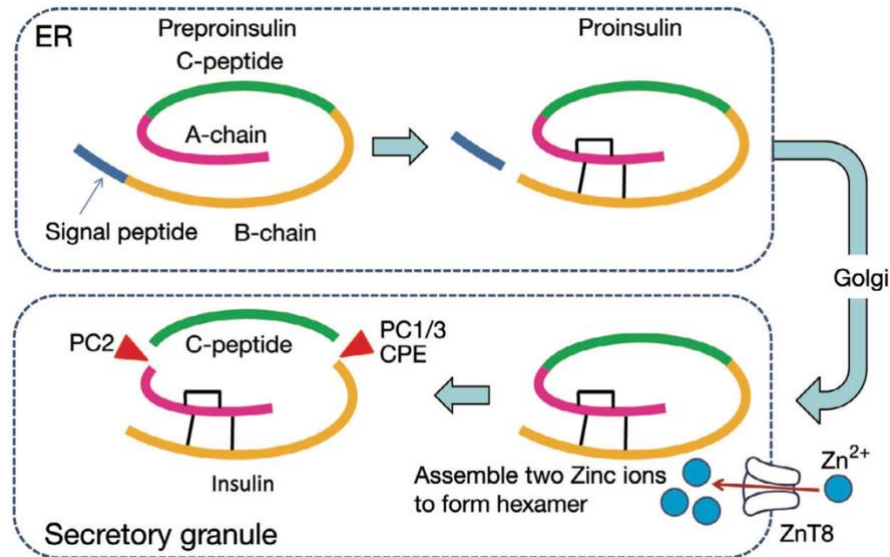


Figura 25 - Representação esquemática da biossíntese da molécula de insulina
ER: retículo endoplasmático; **PC1/3** e **PC2:** convertases de pró-hormônios; **CPE:** carboxipeptidase E; **ZnT8:** transportador de Zn^{2+} (215).

O comprometimento na conversão de pró-insulina, com conseqüente elevação em sua secreção, é uma característica comumente observada em indivíduos com DM1 e DM2. A presença de variantes alélicas que diminuem a atividade proteolítica de CPE, entretanto, só foi observada, até então, em poucos indivíduos com hiperglicemia (216).

O resíduo p.Pro295, no qual o alelo candidato foi identificado no probando P10, está localizado no domínio carboxipeptidase da proteína CPE madura. Curiosamente, OGM *Cpe^{fat}/Cpe^{fat}* (camundongo) portador da substituição p.Ser202Pro possui uma CPE com processamento pós-traducional comprometido, inativa e rapidamente degradada no retículo endoplasmático (217).

O fenótipo observado neste camundongo, que incluía obesidade, infertilidade e DM de início precoce, foi ocasionado em parte pelas altas concentrações de pró-insulina sérica e em ilhotas, com conseqüente diminuição de seu produto maduro circulante (217). Apesar da hiperglicemia, o OGM era responsivo à insulina exógena. Cepa CPE *knockout*, além de apresentar fenótipo similar, cursou, entretanto, com notável resistência insulínica e comprometimento neurológico e comportamental (212).

Os estudos *in vivo* com depleção de CPE em células β demonstraram um efeito citotóxico, com aumento de estresse em RE, decorrente do acúmulo de produtos não processados da biossíntese de insulina e conseqüente morte celular. Já o modelo oposto, com superexpressão de CPE, resultou em proteção da célula β contra apoptose (218).

Adicionalmente, sabemos que CPE possui papel crítico na maturação de outro polipeptídeo secretado pela células β , o IAPP (*islet amyloid polypeptide*). Ilhotas de camundongos Cpe^{fat}/Cpe^{fat} , com deficiência de CPE, também cursaram com comprometimento da etapa de maturação do produto intermediário pró-IAPP, o que resultou em agregados amiloides citotóxicos (218).

Podemos sintetizar, a partir dos dados apresentados, que as consequências em pâncreas endócrino, oriundas da deficiência de CPE em OGM, possuem como base molecular a citotoxicidade produto da hiperproinsulinemia e acúmulo, em RE, de intermediários das vias de biossíntese de insulina e IAPP.

Em humanos, fenótipo OMIM autossômico recessivo que cursa com comprometimento intelectual, hiperglicemia e hipogonadismo hipogonadotrófico já foi reportado na literatura científica associado a CPE (AR - OMIM #619326). Os homozigotos descritos por Alsters *et al.* (2015) (219) e Durmaz *et al.* (2020) (220) possuíam alelos *null*, que resultaram em um códon de parada prematuro com consequente decaimento *nonsense*. Os heterozigotos mapeados pelos autores, em ambas as famílias, não apresentavam nenhuma das manifestações observadas nos probandos.

Curiosamente, a quantificação da expressão de CPE em um dos heterozigotos descritos por Alsters *et al.* (2015) evidenciou, em relação aos controles, concentrações intermediárias de carboxipeptidase (219). Além disso, alelo p.Arg283Trp em heterozigose, reportado como responsável por uma CPE enzimaticamente menos ativa, influenciou a idade ao diagnóstico de DM em algumas famílias ashkenazi, com início mais precoce entre os indivíduos portadores (211).

Busca ativa no repositório alélico ClinVar e na literatura científica não retornou variantes adicionais relacionadas a este ou a outros fenótipos em humanos.

Como inicialmente discutido, OGMs (camundongos) com comprometimento bi e monoalélico de CPE cursaram com alterações pancreáticas, sendo aquelas do OGM Cpe^{fat}/Cpe^{fat} depositadas no MGI detalhadas a seguir:

1] Cepa: HRS/J (HRS)

- Genótipo MGI:3033164: homozigoto | perda de função.
- Fenótipo observado: células β pancreáticas degranuladas; aumento do número de ilhotas; hiperplasia de ilhotas; hipoglicemia; hiperglicemia; hiperinsulinemia (221).

2] Cepa: HRS/J (HRS)

- Genótipo MGI:3033165: homozigoto | perda de função.
- Fenótipo observado: células β pancreáticas degranuladas; hiperplasia de ilhotas; hiperglicemia; hiperinsulinemia (222,223).

As evidências aqui discutidas demonstram o importante papel de CPE no controle da homeostase glicêmica. Sua depleção em OGM evidenciou participação chave no comprometimento de pâncreas endócrino, secundário ao estabelecimento de um ambiente citotóxico.

Devido às características de patogênese molecular envolvida, com acúmulo de produtos intermediários da biossíntese de insulina, dosagem de pró-insulina sérica em P10 e aparentados (heredograma - III e II2), além de análise de cossegregação do alelo candidato, auxiliará, de maneira eficiente, a adequada interpretação do achado molecular.

7.2.9 Probando P11 - MODY não GCK

No probando P11, um caso de MODY não GCK com recorrência do fenótipo em pai e irmã (**Figura 26**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou dois possíveis genes candidatos a associação fenotípica, *MST1* (NM_020998.3 | éxon 2 | c.240_242+14delCCGGTGAGTGGCCACTG | p.Cys80_Arg81delinsTrp) e *COX8A* (NM_004074.3 | éxon 1 | c.22_23delCTinsGG | p.Leu8Gly).

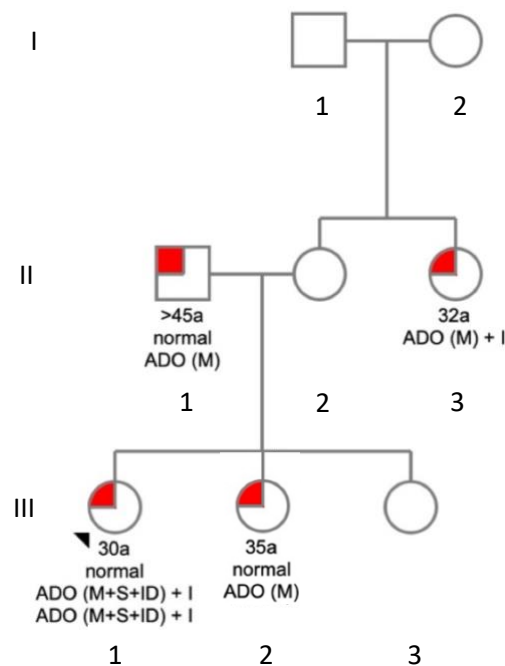


Figura 26 - Heredograma | Probando P11

Quadrado: gênero masculino; **círculo:** gênero feminino; **símbolos com preenchimento parcial: vermelho (hiperglicêmico - DM); símbolo sem preenchimento: normoglicêmico; subtítulo: idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; ADO:** antidiabético oral; **M:** metformina; **S:** sulfonilureia; **ID:** inibidor de DPP4; **I:** insulina.

O gene *MST1* - *Macrophage Stimulating 1* - (OMIM * 142408 | pLI 0,0 | o/e 0,77 | HI 61,36) codifica uma serina/treonina quinase que, com sua expressão ubíqua, está inserida em múltiplas vias de sinalização de processos celulares como morfogênese, proliferação, resposta ao estresse e apoptose (224). Seu transcrito canônico (NM_020998.3) possui 18 éxons e 2.621 pb (**Figura 27**) que codificam um polipeptídeo com 725 aa (NP_066278).



Figura 27 - Estrutura do gene *MST1* - Transcrito NM_020998.3

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); **caixa vazia:** éxon (região não traduzida - UTR - *untranslated region*); **linha contínua:** íntron. Ensembl (131).

Estruturalmente MST1 é constituída, a partir de sua extremidade N-terminal, por um domínio quinase (KD | aa 1-326); domínio inibitório (ID | aa 331-394) e um domínio C-terminal de dimerização Sav-RASSF-Hpo (SARAH | aa 431-487) (**Figura 28**). Podemos, ainda, identificar ao longo de sua estrutura dois resíduos de fosforilação, S320 e S327, sendo a

modificação deste último uma autofosforilação, realizada pelo próprio domínio quinase da proteína (225).

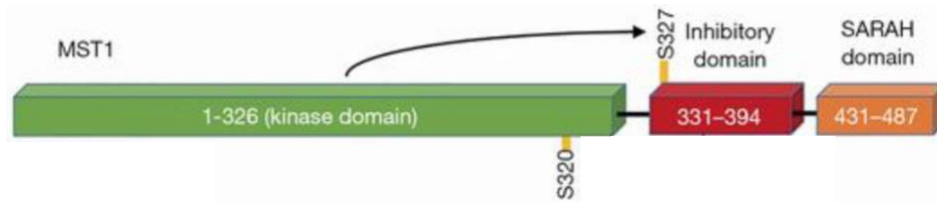


Figura 28 - Estrutura da proteína MST1

Segmentos em destaque: KD (domínio quinase - verde); ID (domínio inibitório - vermelho); domínio de dimerização SARAH (Sav-RASSF-Hpo - laranja); S320 | S327: resíduos de fosforilação (225).

Importante quinase membro da via de sinalização Hippo (proliferação e morte celular), MST1 é alvo, bem como ativador, de caspases amplificadoras da cascata apoptótica. A promoção da morte celular por MST1 ocorre por intermédio de inúmeros alvos/vias moleculares, incluindo LATS1/2, histona H2B, membros da família FOXO, via pró-apoptótica mitocondrial intrínseca, JNK (*stress kinase c-Jun-N-terminal kinase*) e ativação de caspases (224,226).

A apoptose de células β pancreáticas é um acontecimento chave para a deficiência de secreção de insulina em todas as formas de DM e, curiosamente, MST1 possui atividade bastante elevada sob condições diabetogênicas (224,226). De fato, já foi demonstrado que a superexpressão desta quinase é, por si só, suficiente para induzir a apoptose em linhagens de células β de roedores e humanos (224).

Um importante alvo de fosforilação de MST1 é o fator de transcrição PDX1 (224). Elemento crucial para o adequado desenvolvimento e função pancreática, expressões reduzidas de PDX1 afetam tanto a produção e secreção insulínica, como também a sobrevivência da célula β (227,228).

Estudo *in vivo* em linhagens celulares de ilhotas humanas evidenciou que MST1 fosforila PDX1 em p.Thr11, o que resulta em sua ubiquitinação, degradação e consequente comprometimento da secreção de insulina. Adicionalmente foi observado que a superexpressão de MST1 levou à completa perda da secreção de insulina estimulada pela glicose, com diminuição da expressão não apenas de *PDX1*, como de *INS*, *SLC2A2* e *GCK* (224), causas bem documentadas de DMM (106).

De maneira oposta, evidências *in vitro* e *in vivo* demonstram que a depleção de MST1 se correlaciona a uma maior sobrevivência e melhor função da célula β , restaurando a

normoglicemia em OGMs (camundongos) (226). A deficiência desta serina/treonina quinase atenua significativamente a depleção de *PDX1*, *INS*, *SLC2A2* e *GCK*, com uma nítida recuperação do fenótipo observado em seu modelo de superexpressão (224).

Os dados apresentados corroboram o papel de MST1 como uma molécula apoptótica essencial e elemento recorrente em diversas vias de sinalização que culminam na manutenção da sobrevivência e função da célula β , relacionando-se fortemente ao desenvolvimento de DM.

Recentemente estudo demonstrou o uso, em prova de conceito, de um inibidor de tirosina-quinase em linhagem humana de células β , bem como em modelos animais com DM1 e DM2. O fármaco denominado neratinib, quimioterápico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso no tratamento do carcinoma de mama, apresentou resultados promissores no estudo pré-clínico, atenuando a hiperglicemia e melhorando a função e sobrevivência da célula β nos modelos OGMs utilizados (226).

Apesar das observações já realizadas em OGMs e linhagens celulares, nenhum fenótipo humano monogênico, incluindo hiperglicemia, foi reportado na literatura científica, associado a MST1. Busca ativa também não retornou quaisquer achados em estudos GWAS ou OGM (camundongo) com comprometimento de pâncreas endócrino depositado no repositório MGI.

Diante das recentes descobertas realizadas, MST1 justificaria a hiperglicemia observada no probando P11 em um modelo autossômico dominante com ganho de função. Nesta hipótese de causalidade poderíamos esperar por uma insulinopenia progressiva, fruto do papel pró-apoptótico de MST1, além da presença de algum grau de disgenesia pancreática, decorrente da ubiquitinação e degradação secundária de PDX1.

Contra esta hipótese de ganho de função, entretanto, possuímos as características moleculares da variante identificada em P11: p.Cys80_Arg81delinsTrp, localizada no domínio quinase de MST1, é fruto da deleção e substituição dos dois últimos resíduos do éxon 2 deste gene e comprometimento de mais 14 pb no íntron IVS2 adjacente, incluindo seu sítio canônico de *splicing*. Uma variante com tais características (*null*) comumente possui como consequência uma mudança de quadro de leitura em seu produto transcricional, que invariavelmente é degradado via decaimento *nonsense*, pelo surgimento de um códon de parada prematuro.

Análise de cossegregação do alelo candidato, especificamente na irmandade e em tia materna (heredograma - II3 e III2), além de caracterização de disfunção exócrino-pancreática subclínica (dosagem de elastase fecal) e avaliação anatômica de pâncreas por

tomografia computadorizada, poderiam reunir evidências suficientes para adequada interpretação do achado molecular.

O segundo gene candidato, **COX8A** - *Cytochrome C Oxidase Subunit 8A* - (OMIM *123870 | pLI 0,12 | o/e 0,67 | HI 54,98) codifica o menor componente estrutural do complexo COX (*cytochrome c oxidase*), enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial que realiza a transferência de elétrons do citocromo para moléculas de oxigênio, resultando em gradiente eletroquímico na camada mitocondrial interna (229).

COX8A possui 507 pb em seu transcrito canônico (NM_004074.3) (**Figura 29**), compreendendo dois éxons que traduzem um produto proteico com 69 aa (NP_004065).

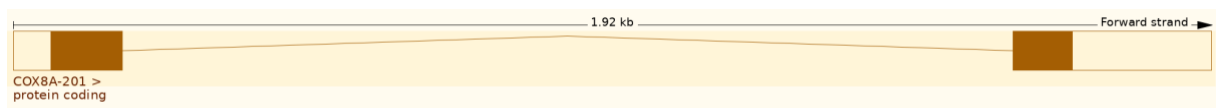


Figura 29 - Estrutura do gene COX8A - Transcrito NM_004074.3
Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region); linha contínua: intron. Ensembl (131).

A cadeia de transporte de elétrons (CTE) localizada na membrana mitocondrial interna (MMI) humana é composta por quatro complexos multiproteicos nomeados I-IV. Em um processo denominado fosforilação oxidativa, CTE utiliza elétrons de metabólitos celulares para produzir um gradiente eletroquímico que alimenta a produção de ATP (230).

O complexo COX, também denominado complexo IV, é o quarto e último elemento do CTE, constituído nos mamíferos por 14 subunidades estruturais e enzimaticamente funcionais (**Figura 30**). Tais subunidades são em parte traduzidas tanto por ribossomos mitocondriais (*core* catalítico) como por ribossomos citoplasmáticos (*core* protetivo). Esta origem traducional distinta confere propriedades físico-químicas específicas a cada grupo de polipeptídeo (230,231).

COX1, COX2 e COX3 são consideradas as maiores e mais importantes subunidades, o *core* catalítico do complexo. São estrutural e funcionalmente suportadas, além de protegidas contra o dano oxidativo, por um grupo de polipeptídeos menores que compõem o *core* protetivo e incluem COX8A (231).

Já é de conhecimento científico que a hiperglicemia é responsável por ocasionar uma elevação na razão ATP/ADP em células β pancreáticas, desencadeando a exocitose dos grânulos de insulina, como produto do processo de fosforilação oxidativa, destacando o papel chave da CTE na patofisiologia do DM (232).

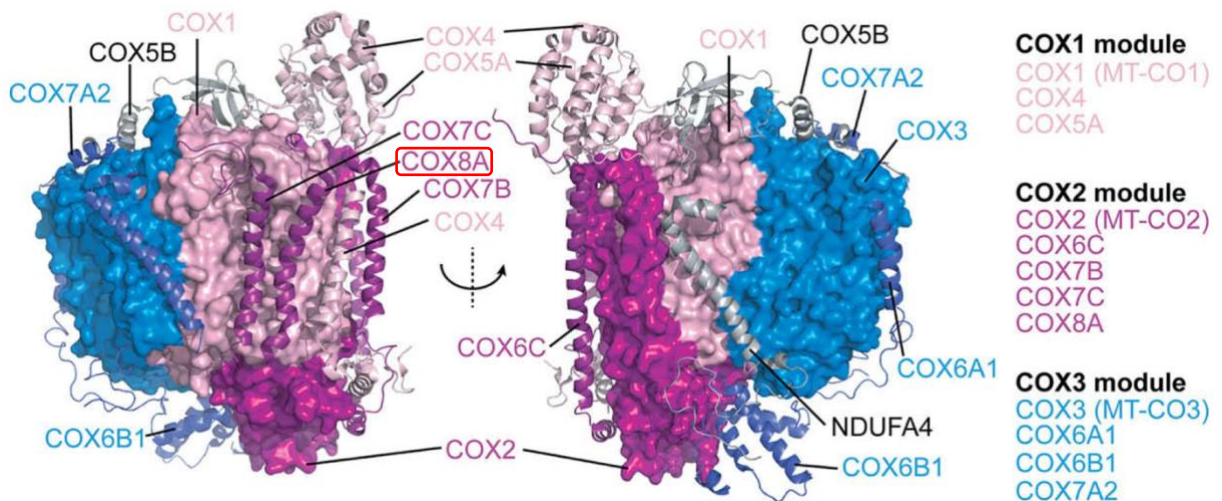


Figura 30 - Estrutura multiproteica do complexo IV (COX)
 rosa claro: módulo COX1; magenta: módulo COX2; azul: módulo COX3; COX8A: destaque em vermelho como subunidade localizada no módulo COX2 (230).

A deficiência isolada do complexo IV (AR - OMIM #220110) é a causa mais frequente de defeitos na CTE, sendo secundária ao comprometimento de *SURF1*, gene nuclear necessário para a correta montagem e estabilização do complexo COX. Variantes alélicas afetando especificamente suas subunidades, entretanto, são pouco reportadas, existindo relatos associados a COX6A1 (AR - OMIM #616039) (233), COX6B1 (AR - OMIM #619051) (234), COX4 (AR - OMIM #612714) (235), COX7B (LXD - OMIM #300887) (236) e COX8A (AR - #619059) (229).

Com exceção de COX4, nenhum dos fenótipos já descritos, decorrentes do comprometimento das subunidades citadas, apresentaram comprometimento pancreático reportado. Shteyer *et al.* (2009) descreveram quatro indivíduos, oriundos de duas famílias árabes, com deficiência exócrina congênita. Alelo não sinônimo (*missense*), em homozigose, no gene *COX4I2* foi identificado em todos os indivíduos após mapeamento de homoziguidade. O fenótipo síndrômico, além de cursar com anemia diseritropoética e hiperostose calvária, também era composto por deficiência exócrina por atrofia pancreática com lipossustituição (235), similar aos achados anatômicos em pacientes com MODY-*PDX1* (22) (casos adicionais ainda não publicados).

Em relação a COX8A, Hallmann *et al.* (2015) descreveram o único fenótipo monogênico já reportado na literatura, um paciente de origem turca com diagnóstico clínico de Síndrome de Leigh (AR | LXD | MT - OMIM #256000), uma neuropatia mitocondrial geneticamente heterogênea, progressiva e extremamente severa. Estudo do exoma revelou alelo

em homozigose localizado em sítio canônico de *splicing* (posição -1 em IVS1). Avaliação fenotípica e genotípica dos pais não foi reportada, bem como qualquer relato de comprometimento pancreático (229).

O repositório ClinVar, bem como a literatura científica, possuem registro de uma única variante não sinônima (*missense*) descrita, associada à Deficiência do Complexo Mitocondrial IV (AR - OMIM #619059). O alelo p.Trp57Cys reportado, entretanto, não possui detalhes disponíveis quanto a sua zigosidade ou apresentação clínica do paciente.

Assim como discutido na seção 7.2.6 com a possibilidade de uma apresentação atípica de mitocondriopatia por comprometimento de gene nuclear (*OPAI*), é sempre importante destacar que tal organela possui função chave no processo de secreção de insulina, sendo causa já documentada tanto de quadros sindrômicos associados a DM (MIDD - *Maternally Inherited Diabetes-Deafness* e MELAS - *Myopathy | Encephalopathy | Lactic acidosis | Stroke*), como de hiperglicemia isolada, não raramente ocasionados pela mesma variante m.3243A>G (MT-TL1:n.14A>G) (20,164).

O probando P11, no momento de sua avaliação, não apresentava quaisquer indícios clínico-laboratoriais adicionais que suscitasse uma suspeita diagnóstica de mitocondriopatia, em especial aqueles observados na Síndrome de Leigh, como descrito por Hallmann *et al.* (2015) em caso com comprometimento bialélico de *COX8A* (229). Investigação ativa de afecções oftálmicas, musculares e neurológicas, entretanto, não foi realizada. Análise de cossegregação do alelo candidato p.Leu8Gly nos familiares disponíveis, em especial irmandade e tia materna (heredograma - II3 e III2, respectivamente) será o próximo passo necessário para o fortalecimento da hipótese de causalidade aqui construída.

7.2.10 Probando P12 - MODY GCK

No probando P12, um caso de MODY *GCK* com recorrência de fenótipo em lado paterno (**Figura 31**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou um possível gene candidato à associação fenotípica, *KL* (NM_004795.4 | éxon 3 | c.1417A>G | p.Arg473Gly). O alelo identificado é, também, compartilhado pelo pai que possui glicemia de jejum alterada, estando ausente na mãe normoglicêmica.

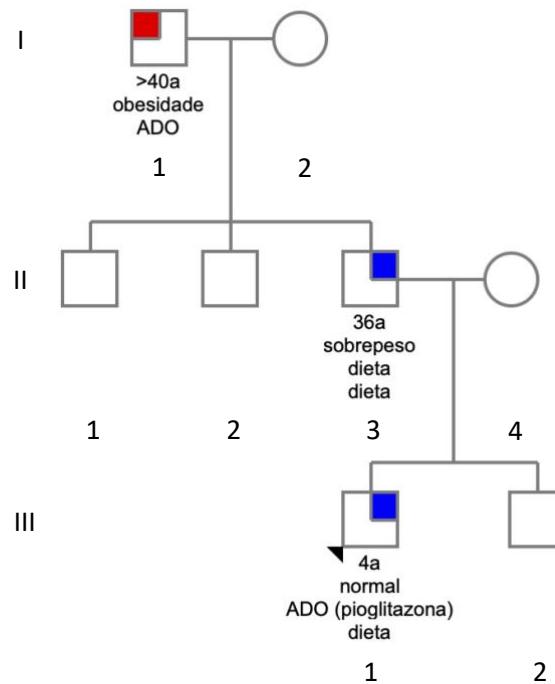


Figura 31 - Heredograma | Probando P12

Quadrado: gênero masculino; círculo: gênero feminino; símbolos com preenchimento parcial: azul (hiperglicêmico - pré-DM) | vermelho (hiperglicêmico - DM); símbolos sem preenchimento: normoglicêmicos; subteto: idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; ADO: antidiabético oral.

O gene ***KL*** - Klotho - (OMIM *604824 | pLI 0,99 | o/e 0,36 | HI 73,06) transcreve um produto canônico (NM_004795.4) com cinco éxons e 5.006 pb (**Figura 32**) que codifica uma beta-glucosidase (catalisa a hidrólise de ligações glicolíticas) transmembrana (Klotho) extremamente conservada evolutivamente (mais de 90% de homologia entre humanos e roedores). Expresso primariamente no tecido renal, foi mapeado há mais de 20 anos (237) e ainda possui inúmeras de suas funções e mecanismos moleculares não esclarecidos (238,239).

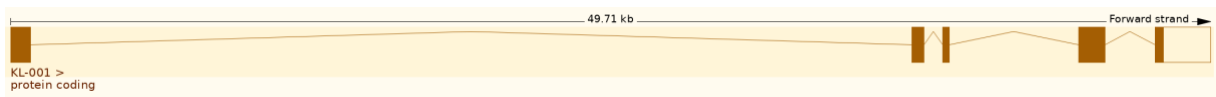


Figura 32 - Estrutura do gene *KL* - Transcrito NM_004795.4

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

A proteína Klotho (NP_004786) possui 1.012 aa, sendo constituída por quatro domínios: sequência sinal (SS) em sua extremidade N-terminal; domínio extracelular com duas repetições internas (domínios homólogos KL1 - aa 34-506 e KL2 - aa 516-948); domínio

transmembrana (TM - aa 982-1002) e um domínio citosólico intracelular curto (**Figura 33**) (239).

A estrutura proteica primária, então ligada à membrana celular, está sujeita a uma modificação pós-traducional (clivagem), mediada por enzimas de superfície celular denominadas “*shedases*”. Em relação à Klotho, ADAM10 e ADAM17 (desintegrina e metaloproteinase A) são as responsáveis por este processo (239).

Tais proteínas possuem como alvos dois sítios de clivagem, o primeiro situado na porção extracelular imediatamente acima da membrana (sítio α), e o segundo situado entre os domínios KL1 e KL2 (sítio β). Após a clivagem, dois produtos derivados da estrutura primária de Klotho podem ser originados, a depender do sítio utilizado, Klotho solúvel (α) ou fragmentos KL1 e KL2 ($\alpha + \beta$) (240).

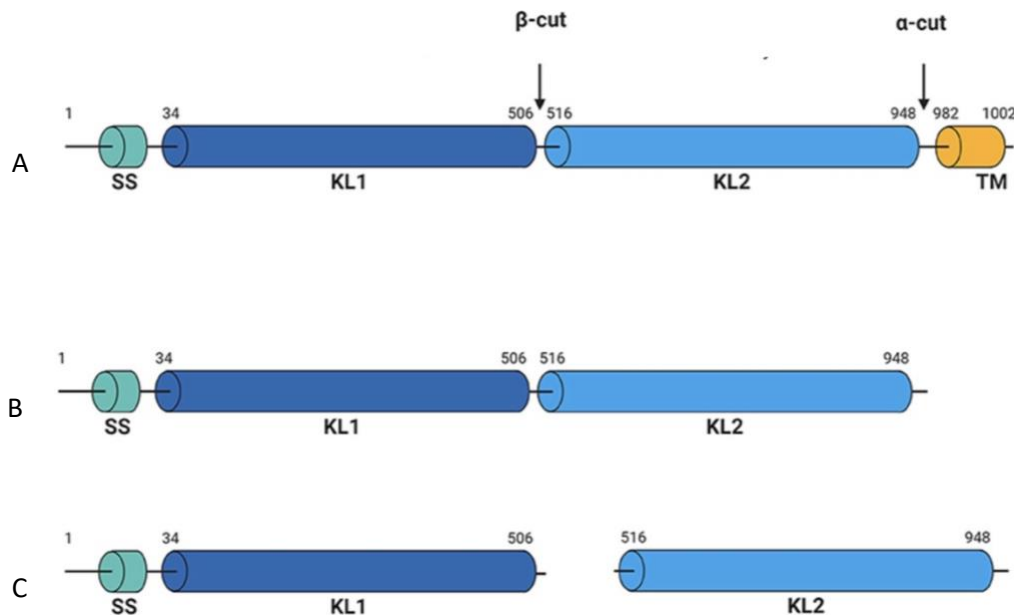


Figura 33 - Estrutura da proteína Klotho

A: proteína Klotho primária ligada à membrana celular; **B:** proteína solúvel produto da clivagem por *shedases* do sítio α ; **C:** proteína solúvel produto da clivagem por *shedases* dos sítios α e β . SS: sequência sinal; TM: domínio transmembrana; KL1 e KL2: domínios homólogos extracelulares; α e β : sítios de clivagem por *shedases* (239).

A porção transmembrana de Klotho, que permanece ligada à membrana celular após clivagem dos sítios α e β , atua primariamente como correceptor obrigatório de FGF23 (fator de crescimento fibroblástico 23), formando um complexo proteico com FGFR (receptor do fator de crescimento de fibroblastos). Mesmo com mecanismos moleculares ainda não completamente elucidados, sabe-se que o eixo FGF23-Klotho exerce inúmeras funções

endócrinas no metabolismo mineral, como a manutenção da homeostasia de fosfato, cálcio e vitamina D (239).

Efeitos sistêmicos, relacionados ou não ao metabolismo mineral, são atribuídos às subunidades solúveis KL1-KL2 ou KL1 e KL2, com evidências demonstrando uma participação na modulação de inúmeras rotas de longevidade evolutivamente conservadas, incluindo aquelas relacionadas à insulina e IGF1 (241), FGF23 (242), monofosfato cíclico de adenisina (AMPc) (243), proteína quinase C (PKC) (244), p53/p21 (245) e sinalização Wnt (246).

Adicionalmente, já foi observado em modelos animais que um comprometimento no metabolismo do fosfato por desregulação do eixo FGF23-Klotho também está associado a mudanças na velocidade de envelhecimento (239,240).

Estudos recentes demonstraram que a proteína Klotho também é expressa nas células β pancreáticas, promovendo a secreção de insulina e protegendo-as na vigência do DM2 (238). Yi Lin *et al.* (2012) observaram que a superexpressão de Klotho em células β de camundongos (linhagem MIN6) regulou positivamente a secreção de insulina dependente de glicose em decorrência de um aumento nos níveis de canais iônicos TRPV2 (*transient receptor potential V2*). TRPV2 em abundância favoreceu o influxo intracelular de cálcio e consequente estímulo à secreção dos grânulos de insulina (247).

O mesmo grupo de pesquisa observou que o *knockdown* de **KL**, utilizando siRNA (*small interfering RNA*) resultou em efeito oposto, diminuindo os níveis de TRPV2 e, conseqüentemente, o influxo de cálcio, atenuando assim a secreção de insulina glicose dependente (247).

Posteriormente os mesmos pesquisadores investigaram como a proteína Klotho preservaria a função da célula β pancreática em uma cepa de camundongo com DM2. Foi constatado que existe uma depleção natural de Klotho nas ilhotas pancreáticas destes animais e que sua expressão em células β atenua a hiperglicemia e melhora a tolerância à glicose. Estes efeitos podem ser atribuídos a uma aparente preservação da célula β por Klotho, com uma diminuição do estresse celular e apoptose induzidos pelo DM2, elevação dos estoques de insulina nas ilhotas e promoção da secreção insulínica mediada por glicose (248).

Além disso, também foi observado que Klotho estimulou a expressão do fator de transcrição Pdx-1 (248), essencial para expressão do gene da insulina e desenvolvimento pancreático, cuja perda de função de seu ortólogo humano é classicamente associado aos

fenótipos de MODY (AD - OMIM #606392) e agenesia pancreática (AR - OMIM #260370) em humanos.

Dentre os fenótipos monogênicos já descritos, associados a **KL** na literatura médico-científica, estão aqueles resultantes de alterações no metabolismo iônico. Comprometimento bialélico do *locus* resulta no desenvolvimento de calcinose tumoral e hiperfosfatemia familiar tipo 3 (AR - OMIM #617994), com o alelo c.578A>G | p.His193Arg, localizado no domínio KL1, frequentemente referenciado (249,250). Dados clínico-laboratoriais dos portadores heterozigotos desta variante, entretanto, não estão disponíveis, bem como o relato de DM na história natural do fenótipo.

ClinVar possui registrados 40 alelos pontuais não sinônimos (*missense*), não benignos/provavelmente benignos, ao longo de toda a extensão da proteína Klotho. Nenhum, entretanto, ocorre no resíduo p.Arg473 (probando P12) (251) que também está localizado no domínio KL1.

Inúmeros estudos de GWAS mapearam nove alelos em **KL** com *p* estatístico $\leq 5 \times 10^{-8}$, e um limítrofe de 6×10^{-7} , em coortes com DM2 (93). Além disso, OGMs (camundongos) com comprometimento em heterozigose e homozigose do *locus* cursaram com alterações de função pancreática, sendo mais especificamente aquelas de pâncreas endócrino detalhadas a seguir:

1] Cepas BALB/c e híbrido C57BL/6J | C3H/J

- Genótipo: MGI: 2181617: homozigoto | hipomórfico.
- Fenótipo: diminuição da secreção de insulina; hipoglicemia (237).

2] Cepas BALB/c e híbrido C57BL/6J | C3H/J

- Genótipo MGI: 3653638: homozigoto | hipomórfico.
- Fenótipo: diminuição da secreção de insulina; hipoglicemia em teste de tolerância à glicose; aumento da sensibilidade à insulina (252).

3] Cepas BALB/c e híbrido C57BL/6J | C3H/J

- Genótipo MGI: 3653640: homozigoto | hipomórfico.
- Fenótipo: hipoglicemia; diminuição da insulinemia; melhora da tolerância à glicose; aumento da sensibilidade à insulina; ilhotas reduzidas; alteração da morfologia das células β pancreáticas (253).

4] Cepas BALB/c e híbrido C57BL/6J | C3H/J

- Genótipo MGI: 3653641: heterozigoto | hipomórfico.
- Fenótipo: diminuição da secreção de insulina; diminuição da insulinemia; hipoglicemia (252).

Curiosamente os últimos modelos animais citados cursaram com consequências opostas àquelas observadas em ensaios utilizando células β de camundongos (linhagem MIN6) ou cepas de roedores com DM2 (db/db). Enquanto os modelos com alelos hipomórficos depositados no MGI apresentaram uma diminuição da glicemia secundária a um aumento da sensibilidade à insulina, os ensaios *knockout* demonstraram piora da homeostase glicêmica diretamente relacionada à depleção de Klotho.

É importante contrastar com estes achados o grande número de alelos estatisticamente significativos mapeados em coortes com DM2 em estudos GWAS, além do fato de que causas bem documentadas de DM2, como as relacionadas aos genes *GCK*, *KCNJ11* e *ABCC8*, podem cursar com manifestações opostas sobre o controle glicêmico. Nestes casos a hiperglicemia ou hipoglicemia é condicionada ao tipo de defeito molecular (ganho ou perda de função) e número de alelos comprometidos (homozigose ou heterozigose) (254).

O probando P12 e seu pai não possuem nenhum indício clínico de comprometimento da homeostase iônica, mais especificamente da calcemia e/ou fosfatemia. Investigação laboratorial ativa, entretanto, não foi realizada. Os únicos dados relacionados disponíveis são de P12 e demonstram valores adequados de PTH (paratormônio) e vitamina D (calcifediol | 25-hidróxivitamina D) aos 12 anos de idade. Análise de cossegregação da variante nos familiares paternos auxiliará uma melhor interpretação do achado genético.

7.2.11 Probando P13 - MODY não *GCK*

No probando P13, um caso de MODY não *GCK* com recorrência do fenótipo em pais, avós maternos, cinco tios-avós maternos, tio paterno e prima paterna em primeiro grau (**Figura 34**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou dois possíveis genes candidatos à associação fenotípica, *KL* (NM_004795.4 | éxon 1 | c.317A>G | p.Asn106Ser) e *RASGRF1* (NM_002891.4 | éxon 5 | c.766G>A | p.Val256Met).

O gene *KL* já possui outro alelo priorizado em nossa coorte. Localizado no resíduo p.Arg473, a variante foi identificada no probando P12 e em seu pai, ambos com hipótese

diagnóstica de MODY *GCK*. Assim como neste último, o alelo p.Asn106Ser de P13 está localizado no domínio KL1 da proteína Klotho, detalhada no item 7.2.10 quanto a suas características estruturais, funcionais e possível interface com a manutenção da homeostase glicêmica.

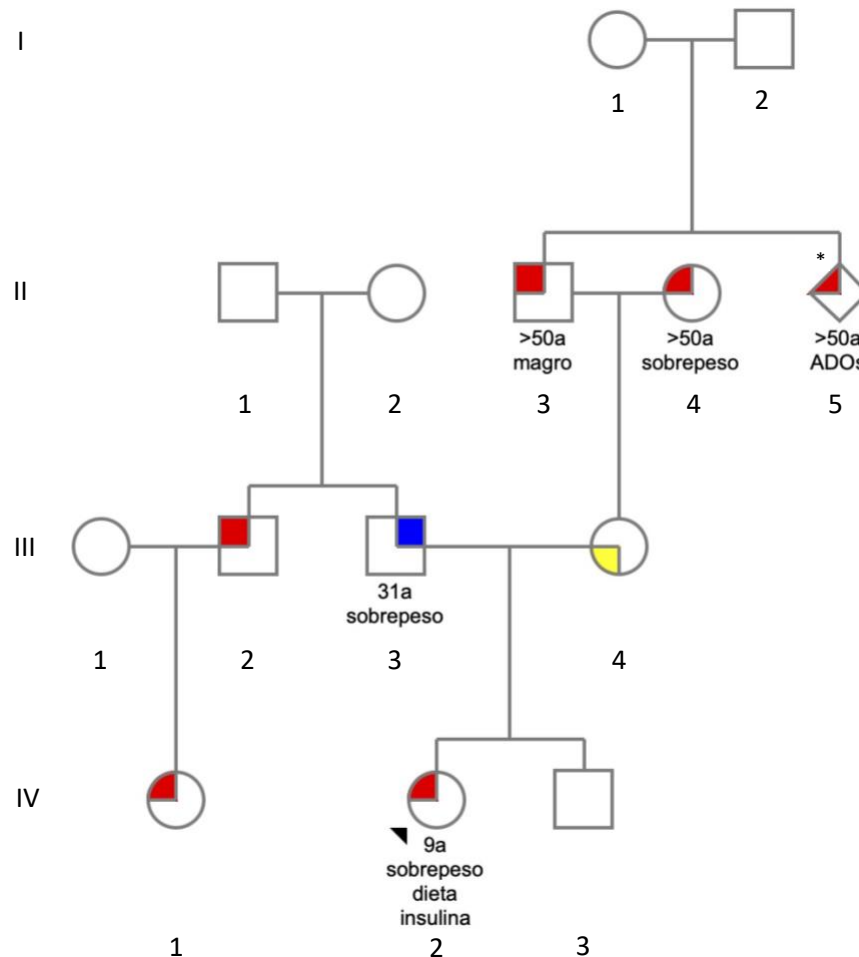


Figura 34 - Heredograma | Probando P13

Quadrado: gênero masculino; círculo: gênero feminino; símbolos com preenchimento parcial: azul (hiperglicêmico - pré-DM) | vermelho (hiperglicêmico - DM) | amarelo (histórico de diabetes *mellitus* gestacional); símbolos sem preenchimento: normoglicêmicos; *indivíduos II-5: 5 tios-avós maternos; subtítulo: idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; ADO: antidiabético oral.

Além da diferença de apresentação clínica de P12 em relação a P13, MODY *GCK* e não *GCK*, respectivamente, a variante identificada neste último (c.317A>G | p.Asn106Ser) não está ausente em bases de dados genômico-populacionais, tendo sido mapeada em heterozigose em um indivíduo europeu não finlandês (0,0004% | ~1/250.000) (81). Adicionalmente, alelo apresenta um *score* REVEL < 0,7 (0,04). Tal achado molecular poderia adquirir uma evidência maior de associação causal, caso fosse demonstrado um evento *de novo*

durante análise de cossegregação, uma vez que pais de P13 não possuem uma apresentação típica de MODY: pai pré-DM aos 31 anos com sobrepeso e mãe normoglicêmica com histórico de DM gestacional.

O segundo gene candidato, **RASGRF1** - *Ras Protein Specific Guanine Nucleotide Releasing Factor 1* - (OMIM *606600 | pLI 1,0 | o/e 0,11 | HI 48,53) possui um transcrito canônico (NM_002891.4) com 28 éxons e 6.294 pb (**Figura 35**), traduzindo um produto de 1.273 aa (NP_002882). A proteína RASGRF1 é um fator de troca de nucleotídeos guanina (GEF - *guanine nucleotide exchange factor*), família de proteínas que desempenham papel na liberação de GDP (guanosina difosfato) de pequenas GTPases (*small G-proteins*), permitindo sua associação à GTP (guanosina difosfato) e consequente ativação (255).

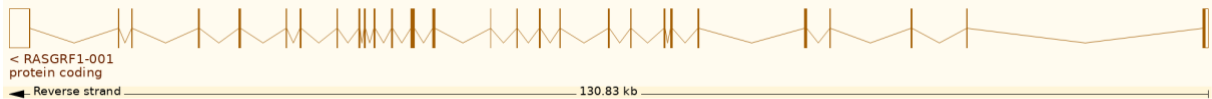


Figura 35 - Estrutura do gene RASGRF1 - Transcrito NM_002891.4

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

RASGRF1 possui inúmeros *motifs* e domínios ao longo de toda a sua estrutura (**Figura 36**), sendo estes: dois domínios homólogos à pleckstrina (PH1 | aa 23-130 e PH2 | aa 460-588); uma super-hélice (CC | aa 151-193); domínio isoleucina-glutamina (IQ | aa 204-226); domínio de homologia Dbl (DH | aa 244-430); *Ras Exchanger-stabilization Motif* (REM | aa 634-749); região rica em prolina | ácido glutâmico | serina | treonina (PEST | aa 749-1027) e, por fim, um domínio homólogo a CDC25 (aa 1027-1259) (256).

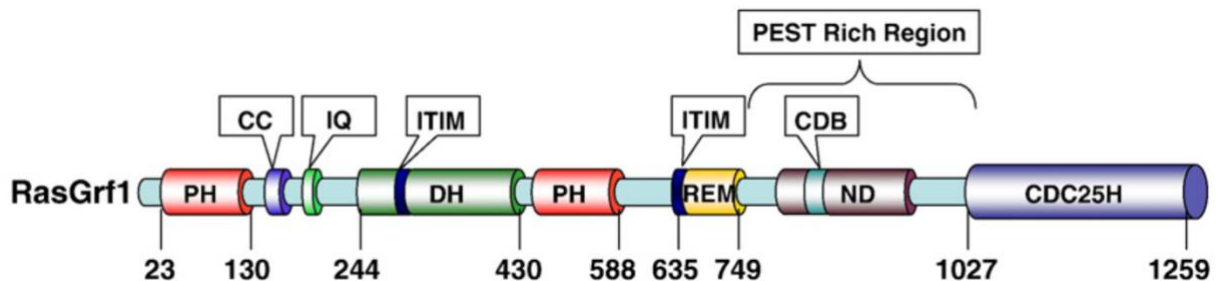


Figura 36 - Estrutura da proteína RASGRF1

PH: domínio homólogo à pleckstrina; CC: super-hélice; IQ: domínio isoleucina-glutamina; DH: domínio de homologia Dbl; ITIM: *motifs* tirosina de inibição; REM: *Ras Exchanger-stabilization Motif*; PEST: região rica em prolina | ácido glutâmico | serina | treonina; ND: domínio neurológico; CDB: *box* de destruição de ciclinas; CDC25H: domínio homólogo a CDC25 (256).

As pequenas GTPases, alvos da ação de RASGRF1, pertencem à grande família de proteínas Ras, responsáveis por regular inúmeras rotas de sinalização relacionadas a crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (257). Suas múltiplas funções são reflexo de grande habilidade de ligação e ativação de efetores, denominados efetores da via de sinalização Ras (257).

Inúmeras moléculas efectoras de Ras já foram relacionadas à manutenção da célula β pancreática, como IRS-2 (*insulin receptor substrate-2*) (258), CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*) (259), IGF1 (*insulin-like growth factor-1*) (258), PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) e AKT (*protein kinase B*) (260). A proteína Ras cicla entre sua conformação inativa (ligada a GDP) e ativa (ligada a GTP) devido à ação de RASGRF1 (257).

RASGRF1 é um gene que sofre *imprinting*, expresso apenas após o nascimento. Presente em abundância no sistema nervoso central e em menor quantidade em outros tecidos, como ilhotas pancreáticas, camundongos *knockout* para **RASGRF1** cursam caracteristicamente com comprometimento de memória e aprendizado, restrição de crescimento pós-natal e diminuição dos níveis séricos de IGF1 (256,257).

Em relação à célula β pancreática, fenótipos não neurológicos observados em camundongos com deficiência de RASGRF1 corroboram o papel desta GEF no controle da proliferação celular e neogênese da célula β , com consequente manutenção da glicemia (256). Uma explicação para a restrição de proliferação observada é que a deficiência de RASGRF1 comprometeria a ativação do eixo PI3K-AKT, ativado em inúmeros tecidos por ação da insulina e importante para a transdução do sinal mitogênico e regulação da homeostase glicêmica (257).

O alelo c.766G>A | p.Val256Met, identificado em P13, está localizado no domínio DH da proteína RASGRF1. Extremamente conservado evolutivamente, DH atua em conjunto com o domínio PH2 adjacente na ação catalítica que culmina na troca de moléculas GDP/GTP em membros da família de GTPases (261). Outras funções, empiricamente já atribuídas ao DH, são o correto direcionamento de RASGRF1 a compartimentos específicos da membrana celular (262); autorregulação, participando da via de inibição de RASGRF1 (262) e, ainda, formação de homo-heterodímeros de proteínas RASGRF, estrutura importante para a ativação de determinadas vias de sinalização (263).

Freshney NW, Goonesekera SD, Feig LA (1997) avaliaram a consequência de variantes pontuais no domínio DH, mais especificamente entre os resíduos 390-396 (264). Os dados obtidos demonstraram um comprometimento na ativação de ERK/MAPK mediada por cálcio, com preservação da localização celular de RASGRF1 e de sua atividade GEF. MAPK

ou *Mitogen Activated Protein Kinases* são quinases que fosforilam especificamente resíduos serina e treonina, envolvidas em vias de sinalização que regulam funções celulares como proliferação, expressão gênica, diferenciação, mitose e apoptose (265).

Não existe descrição na literatura científica, até o momento, de fenótipos humanos condicionados por herança mendeliana associados a variantes no gene **RASGRF1**. É importante destacar, entretanto, que estudo GWAS recente evidenciou no gene um alelo com significância limítrofe (6×10^{-7} | rs28582793), associado aos traços de: sensibilidade da célula β pancreática à glicose e biomarcador para DM (266).

Além disso, OGM (camundongo) com comprometimento em homozigose do *locus* cursou com alterações de função pancreática, sendo mais especificamente aquelas de pâncreas endócrino detalhadas a seguir:

1] Cepa C57BL/6N

- Genótipo: MGI: 2669007: homozigoto | *knockout*.
- Fenótipo: diminuição do número de células β pancreáticas; redução do tamanho das ilhotas pancreáticas; hipoinsulinemia; intolerância à glicose (257).

Mesmo não possuindo fenótipos humanos de origem monogênica já identificados, as características estruturais de **RASGRF1**, mais especificamente o número e categoria dos alelos mapeados por estudos genômico-populacionais, sugerem uma intolerância a variantes LoF (pLI = 1). Sua haploinsuficiência, entretanto, não possui uma inferência significativa (DECIPHER 48.53%) e o único modelo de depleção existente é em homozigose.

Desta forma, de maneira similar ao **KL**, **RASGRF1** seria beneficiado pela existência de um evento *de novo* durante a análise de cossegregação, uma vez que os pais do probando não possuem uma apresentação típica de MODY. A conclusão de tal etapa será fundamental para a correta interpretação da hipótese causal de ambos os genes candidatos.

7.2.12 Probando P14 - MODY não GCK

No probando P14, um caso de MODY não GCK com recorrência do fenótipo em mãe, tios maternos e avó materna (**Figura 37**), o processo de priorização gênica/alélica

evidenciou um possível gene candidato a associação fenotípica, **ZBED3** (NM_032367.4 | éxon 3 | c.82G>C | p.Gly28Arg).

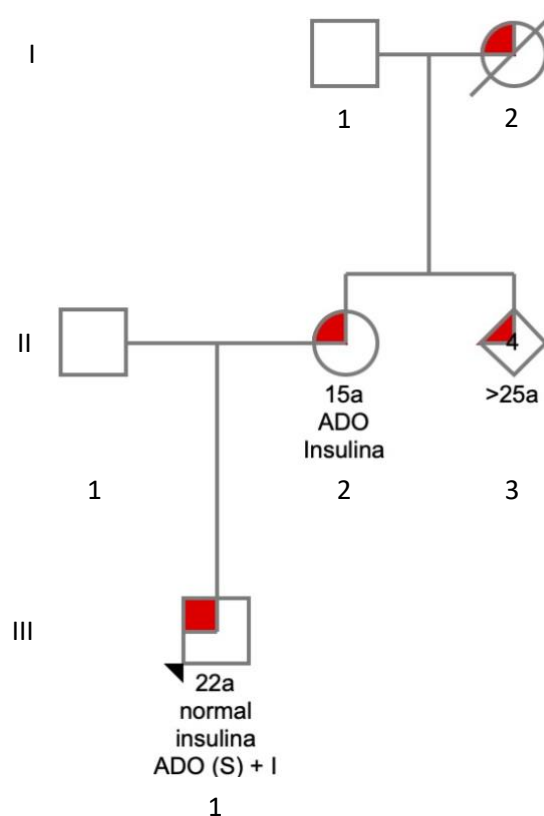


Figura 37 - Heredograma | Probando P14

Quadrado: gênero masculino; **círculo:** gênero feminino; **símbolo com linha diagonal:** falecido; **símbolos com preenchimento parcial: vermelho** (hiperglicêmico - DM); **símbolos sem preenchimento:** normoglicêmicos; **subtexto:** idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; **ADO:** antidiabético oral; **S:** sulfonilureia; **I:** insulina.

O gene **ZBED3** - *Zinc Finger BED-Type Containing 3* - (OMIM *615250 | pLI 0,08 | o/e 1,25 | HI 83,9) transcreve um produto canônico (NM_032367.4) com três éxons e 6.172 pb (**Figura 38**), responsável por um polipeptídeo constituído por 234 aa (NP_115743).

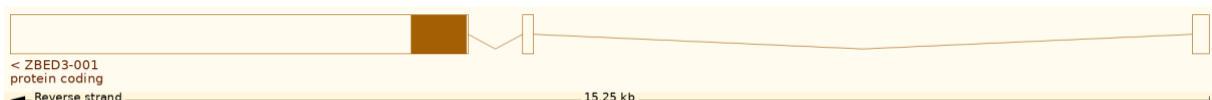


Figura 38 - Estrutura do gene ZBED3 - Transcrito NM_032367.4

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); **caixa vazia:** éxon (região não traduzida - UTR - *untranslated region*); **linha contínua:** intron. Ensembl (131).

ZBED3 pertence a uma família de proteínas *BED-zinc finger* que possui mais de 2.000 integrantes preditos, a maioria, entretanto, ainda carece de comprovações empíricas quanto a sua estrutura e função. Estudos indicam que a ligação ao DNA é uma das principais

funções desta classe de proteínas que compartilham a presença de um domínio BED (nomeado assim em homenagem às proteínas **BEAF** e **DREF** de *Drosophila*, também identificadas em outros organismos) (267,268).

Estruturalmente ZBED3 é constituída, a partir de sua porção C-terminal, pelo domínio BED (aa 43-115) e pelo domínio de ligação à Axin (aa 116-122), em N-terminal (**Figura 39**) (268).



Figura 39 - Estrutura da proteína ZBED3
Segmentos em destaque: domínio BED (A1-A4) e domínio de ligação à Axin (azul) (268).

A Axin, cujo sítio de ligação está localizado próximo ao domínio BED de ZBED3, é um regulador negativo chave da via de sinalização Wnt/ β catenina, uma das principais vias de controle do crescimento e desenvolvimento, cujos fatores estimulatórios atuam em diversas etapas da proliferação celular (269). Adicionalmente já foi reportado que tal via é responsável por regular a adipogênese, possuindo um *link* metabólico com obesidade, dismetabolismo e resistência insulínica; sendo, inclusive, observados níveis séricos elevados de ZBED3 em indivíduos com intolerância à glicose ou recentemente diagnosticados com DM2 (270).

Apesar das recentes e crescentes descobertas relacionadas à influência de ZBED3 sobre a proliferação e invasividade de células cancerígenas, mais especificamente pulmonares (267,268), sua interface metabólica ainda necessita de maiores elucidções (270).

Estudos GWAs já mapearam inúmeros alelos em **ZBED3** (p estatístico $\leq 5 \times 10^{-8}$) associados a traços como DM2 (7 alelos); níveis glicêmicos reduzidos (2 alelos) e percentuais menores de HbA1c (3 alelos) (**Tabela 13**) (93), demonstrando assim um aparente efeito tanto protetivo como de risco para DM.

Não existe relato, até a presente data, de fenótipos mendelianos relacionados ao ganho ou perda de função de ZBED3; além disso, OGMs *knockout* depositados no MGI não cursaram com comprometimento pancreático ou de metabolismo glicêmico.

Recentemente Stankute *et al.* (2020) identificaram, utilizando painel com 307 potenciais genes candidatos, um probando portador de variante não sinônima (*missense*) em **ZBED3** (p.Leu71Val) em coorte de pacientes lituanos com diagnóstico de DM entre 0-25 anos com autoanticorpos não reagentes (anti-GAD | anti-IA2 | IAA) (108). Diferente de nosso alelo

candidato, que está localizado na porção C-terminal da proteína e fora de seus sítios funcionais já caracterizados, o resíduo p.Leu71 localiza-se no domínio BED de ligação ao DNA.

Mesmo diante de incertezas quanto ao real papel de ZBED3 sobre o metabolismo glicêmico, com achados dicotômicos em estudos de associação (risco e proteção), estudo de cossegregação do alelo candidato nos familiares disponíveis (heredograma - II1, II2 e II3) auxiliará uma melhor interpretação do achado molecular, podendo contribuir para o fortalecimento de nossa hipótese de causalidade.

7.2.13 Probando P15 - MODY não *GCK*

No probando P15, um caso de MODY não *GCK* com recorrência do fenótipo em mãe (**Figura 40**), o processo de priorização gênica/alélica evidenciou um possível gene candidato à associação fenotípica, *PTPRD* (NM_002839.3 | éxon 21 | c.1280G>A | p.Arg427Gln).

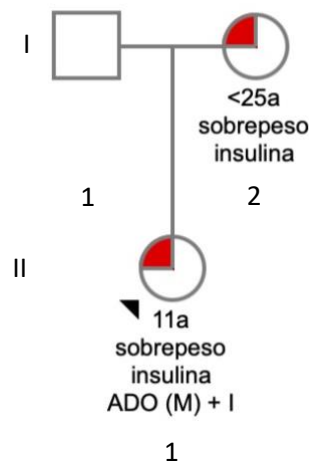


Figura 40 - Heredograma | Probando P15

Quadrado: gênero masculino; círculo: gênero feminino; símbolos com preenchimento parcial: vermelho (hiperglicêmico - DM); símbolo sem preenchimento: normoglicêmico; subtítulo: idade ao diagnóstico | IMC ou peso referido ao diagnóstico | tratamento ao diagnóstico | tratamento atual; ADO: antidiabético oral; I: insulina.

O gene *PTPRD* - *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D* - (OMIM *601598 | pLI 0,0 | o/e 0,05 | HI 41,42) possui um transcrito canônico (NM_002839.3) com 43 éxons e 9.911 pb (**Figura 41**) que traduz um polipeptídeo constituído por 1.912 aa (NP_002830).

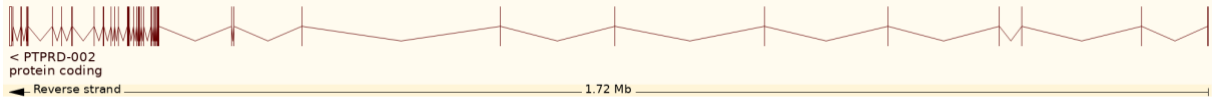


Figura 41 - Estrutura do gene *PTPRD* - Transcrito NM_002839.3

Caixa preenchida: éxon (região codificadora); caixa vazia: éxon (região não traduzida - UTR - untranslated region); linha contínua: íntron. Ensembl (131).

PTPRD codifica uma molécula de adesão celular neuronal e especificador sináptico que possui indícios de participação em processos biológicos que vão desde o vício, doença de Alzheimer, comprometimento cognitivo, mudança de humor, até comportamento obsessivo compulsivo (271).

Estruturalmente, *PTPRD* possui em sua porção extracelular (extremidade N-terminal) três domínios similares a imunoglobulinas (*Ig-like C2 type 1* | *Ig-like C2 type 2* | *Ig-like C2 type 3*) (aa 30-250) e oito domínios de fibronectina III (aa 318-1086), além de um domínio transmembrana e dois domínios D1 e D2, intracelulares, similares à tirosina-fosfatase (aa 1356-1611 | aa 1643-1902, respectivamente) (272) (**Figura 42**).



Figura 42 - Estrutura da proteína *PTPRD*

Segmentos em destaque: domínios *Ig-like C2 type 1-3* (roxo); domínios de fibronectina III (amarelo) e domínios D1 e D2 (verde) (273).

O domínio extracelular fibronectina III, no qual está localizado o alelo candidato p.Arg427Gln identificado em P15, realiza inúmeras interações moleculares, como com a proteína LRRC4B, de modo a promover a adesão celular neuronal e origem sináptica produtos da ativação de *PTPRD* (271,274).

Além da possível relação com manifestações neurológicas, indícios de associação com fenótipos sistêmicos também já foi reportada, mais especificamente no que diz respeito à suscetibilidade ao DM, hipertensão refratária ao tratamento e anormalidades craniofaciais com comprometimento auditivo. Nenhum destes fenótipos, entretanto, foi observado em OGMs (camundongos) com comprometimento da expressão de *PTPRD* (271).

É importante destacar que *PTPRD* pertence a uma subfamília de receptores IIA que inclui membros estruturalmente muito parecidos, como *PTPRF* e *PTPRS* (275). Modelos *knockout* (camundongos) para estes dois últimos cursaram com disglícemia, seja por

diminuição da insulinemia e glicemia em PTPRF (276) ou, ainda, pela hipoplasia pancreática observada no modelo com comprometimento de PTPRS (277).

De fato, dois alelos já foram mapeados em estudos GWAs, relacionando o PTPRD ao risco (GCST000601) e proteção (GCST010557) em DM2, ambos com valor p estatístico $\leq 5 \times 10^{-8}$ (**Tabela 13**). É importante destacar, entretanto, que tal evidência pode ser questionada, visto que estudos posteriores não conseguiram replicar tal associação (278,279).

Até o momento nenhum fenótipo humano monogênico foi descrito relacionado, de maneira definitiva, ao gene *PTPRD*, bem como quaisquer manifestações em pâncreas endócrino foram reportadas em OGM (camundongo) depositado no MGI.

Shim *et al.* (2015) (280) realizaram o estudo do exoma em seis famílias cujo o probando possuía um diagnóstico clínico-laboratorial de MODY. Todos os casos índices apresentavam peptídeo C detectável, autoanticorpos (anti-GAD | anti-IA2 | IAA) não reagentes e DM diagnosticado antes dos 25 anos. Variante não sinônima (*missense*) p.Thr207Ile em *PTPRD* (domínio *Ig-like* C2) foi identificada em um dos probandos e em sua mãe, diagnosticada com DM aos 30 anos de idade. O alelo não estava presente no pai com DM nem na irmã normoglicêmica também testada. Os autores destacam o notável histórico de DM em lado materno, com destaque para tios e avó. Dados clínico-laboratoriais detalhados destes indivíduos, entretanto, não foram reportados. Nenhuma afecção neurológica foi reportada nesses pacientes, também ausentes, até a presente data, no probando P15 aqui descrito.

Ainda se questiona como *PTPRD* atuaria sobre a homeostase glicêmica, havendo hipóteses sobre o fato de que um aumento na atividade fosfatase de fosfotirosinas (PTP) comprometeria a secreção de insulina devido a uma redução na razão ATP/ADP ou a fosforilação de proteínas chave para a exocitose deste hormônio (281).

Independentemente de possível patogênese molecular por ganho de função, como discutido em relação aos genes candidatos *NOTCH1* e *FOXO1* nos tópicos 7.2.3 e 7.2.7, respectivamente, análise de cossegregação da variante nos familiares disponíveis (heredograma - II1 e II2), e nos demais pertencentes a família, auxiliará a interpretação do achado genômico.

8 CONCLUSÃO

A investigação genético-molecular por sequenciamento completo do exoma em pacientes clínico-laboratorialmente diagnosticados com MODY e DMN, proposta e realizada pelo presente estudo foi capaz de identificar, a partir de um processo de priorização gênica e alélica agnóstica, antigos e novos *loci* candidatos à associação fenotípica.

Uma taxa de descoberta de 68,7% (11/16) foi observada entre os probandos investigados, sendo maior entre aqueles com diagnóstico de MODY não-*GCK* (88,8% - 8/9). Nenhum gene candidato foi priorizado em cinco casos, incluindo a totalidade daqueles com DMN.

Dentre os 14 *loci* únicos mapeados, recorrência foi observada em apenas três (*KL* - intracoorte | *PTPRD* e *ZBED3* - literatura científica), além da caracterização de uma possível apresentação atípica do já documentado fenótipo mendeliano de Atrofia Óptica Autossômica Dominante com ou sem Surdez e Diabetes (*OPAI*).

A investigação majoritária de probandos sem seus familiares dificultou e limitou algumas etapas do processo investigativo, como o mapeamento de eventos mutacionais *de novo*. Este e outros elementos, talvez tenham contribuído para a não priorização de alelos/genes candidatos em 31,3% (5/11) da coorte, a ser explicado, também, pela presença de variantes estruturais não completamente investigadas ou pela existência de defeitos moleculares mais raros, como aqueles comprometendo regiões regulatórias ou sítios não-canônicos/críticos de *splicing*.

Em suma, o presente trabalho permitiu uma ampliação da heterogeneidade genética do DM de origem monogênica por meio do mapeamento de novos *loci* candidatos à associação fenotípica, proporcionando perspectivas para expansão do espectro fenotípico deste tipo raro de disglucemia.

ANEXO A - Formulário eletrônico para o encaminhamento de pacientes com suspeita clínica de MODY

Questionário MODY - Dados Clínico-laboratoriais - Casos Índices

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

CHECKLIST - Dados necessários para o preenchimento do formulário eletrônico de MODY:
<https://goo.gl/kaysQh>

*Obrigatório

1. Endereço de e-mail *

2. Nome completo do paciente *

3. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

Masculino

Feminino

4. Registro HCFMUSP

(se disponível)

5. Telefone de contato do paciente

(DDD) número do telefone

6. Médico solicitante *

7. CRM do médico solicitante *

8. Telefone de contato do médico solicitante

(DDD) + número do telefone

9. Local do serviço de origem *

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

10. Suspeita Clínica *

Tipo de MODY

Marcar apenas uma oval.

- MODY (subtipo não definido)
- MODY-GCK (MODY 2)
- MODY não GCK
- Outro: _____

11. Cidade e Estado de nascimento *

12. Data do nascimento **Exemplo: 15 de dezembro de 2012*

13. Idade atual *

(anos)

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

(anos)

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

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

Peso**16. Peso ao nascimento**

(g)

17. Possui dados de peso da época do diagnóstico de diabetes ou pré-diabetes? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim *Ir para a pergunta 17.*
- Não *Ir para a pergunta 20.*

Dados antropométricos AO DIAGNÓSTICO

18. Peso ao diagnóstico (Kg) *

19. Altura ao diagnóstico (m) *

20. IMC ao diagnóstico (Kg/m²)

Ir para a pergunta 21.

Peso referido AO DIAGNÓSTICO

21. Peso ao diagnóstico *

(referido pelo paciente na época do diagnóstico)

Marcar apenas uma oval.

- Baixo peso
- Peso normal
- Sobrepeso
- Obesidade

Dados antropométricos ATUAIS

22. Peso atual (Kg) *

23. Altura atual (m) *

24. IMC atual *

(kg/m²)

Sintomas ao diagnóstico

25. Sintomas relacionados a hiperglicemia ao diagnóstico *

Marcar apenas uma oval.

- Sintomático *Ir para a pergunta 25.*
- Assintomático *Ir para a pergunta 26.*

Sintomático

26. Quadro clínico *

Marque todas que se aplicam.

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

Ir para a pergunta 27.

Assintomático

27. O que motivou o diagnóstico de diabetes? *

Marque todas que se aplicam.

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

Ir para a pergunta 27.

Tratamento do diabetes

28. Tratamento na época do diagnóstico de diabetes *

Marcar apenas uma oval.

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

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

Informar número de dias ou meses ou anos

30. Duração do tratamento previamente descrito *

Informar número de dias ou meses ou anos

31. Tratamento atual do diabetes **Marcar apenas uma oval.*

- Apenas insulina *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 32.*
- Insulina + anti-diabético oral *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 35.*
- Apenas sulfoniluréia *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 39.*
- Apenas metformina *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 43.*
- Apenas inibidor de DPP4 *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 43.*
- Associações de anti-diabéticos orais *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 42.*
- Apenas dieta *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 43.*

32. Idade do início do tratamento atual *

Tratamento atual do DM

Insulina

33. Tipo de insulina **Marque todas que se aplicam.*

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

34. Dose TOTAL de insulina utilizada (unidades / kg / dia) **(dose de insulina basal + insulina bolus)*

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

*Ir para a pergunta 43.***Tratamento atual do DM**

Associação insulina + anti-diabético oral (ADO)

Insulina**36. Tipo de insulina utilizada (associada a ADO) ****Marque todas que se aplicam.*

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

37. Dose TOTAL de insulina (unidades / kg / dia) utilizada (associada a ADO) *

(dose de insulina basal + insulina bolus)

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

*

(informar se em meses ou anos)

Anti-diabéticos orais

39. ADO(s) utilizado(s) na associação *

Marque todas que se aplicam.

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

Ir para a pergunta 43.

Tratamento atual do DM

Sulfoniluréia

40. Tipo de sulfoniluréia *

Marcar apenas uma oval.

- Glibenclamida
- Gliclazida
- Glimepirida
- Glipizida

41. Dose total diária de sulfoniluréia *

(mg/dia)

42. Tempo de uso de sulfoniluréia *

(informar se em meses ou anos)

Ir para a pergunta 43.

Tratamento atual do DM

Associações de anti-diabéticos orais (ADOs)

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

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

Antecedente Familiar**44. História familiar de diabetes/pré-diabetes? ****Marcar apenas uma oval.*

- Sim *Ir para a pergunta 44.*
- Não *Ir para a pergunta 65.*
- Desconhecido *Ir para a pergunta 65.*

Com antecedente familiar**45. Número de familiares com diabetes/pré-diabetes ***

46. Pais com DM/pré-DM? **Marcar apenas uma oval.*

- Sim *Ir para a pergunta 46.*
- Não *Ir para a pergunta 52.*
- Não soube informar *Ir para a pergunta 52.*

*Ir para a pergunta 46.***Histórico familiar de DM/Pré-DM - Pais****47. Parentesco ****Marque todas que se aplicam.*

- Pai
- Mãe

48. Idade atual (anos) **[ou informar se falecido(a)]*

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

Marcar apenas uma oval.

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

50. Obesidade ou sobrepeso ao diagnóstico? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

51. Tipo de diabetes referido *

Marcar apenas uma oval.

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

52. Tratamento atual *

Marque todas que se aplicam.

- Insulina
- Sulfoniluréia
- Metformina
- Apenas dieta
- Outros

Histórico familiar de DM/Pré-DM

53. Avós com DM/Pré-DM? *

Marcar apenas uma oval.

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

Histórico familiar de DM/Pré-DM - Avós

54. Parentesco *

Marque todas que se aplicam.

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

55. Idade atual (anos) *

[ou informar se falecido(a)]

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

Marcar apenas uma oval.

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

57. Obesidade ou sobrepeso ao diagnóstico? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

58. Tipo de diabetes referido *

Marcar apenas uma oval.

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

59. Tratamento atual *

Marque todas que se aplicam.

- Insulina
- Sulfoniluréia
- Metformina
- Apenas dieta
- Outros

Histórico familiar de DM/Pré-DM - Outros parentes

60. Existem outros familiares com DM/Pré-DM?

Marcar apenas uma oval.

- Sim *Ir para a pergunta 60.*
- Não *Ir para a pergunta 64.*

Histórico familiar de DM/Pré-DM - Outros parentes

61. Número de familiares com DM/Pré-DM *

62. Grau de parentesco destes familiares em relação ao caso índice *

63. **Em relação ao familiar com diagnóstico de DM/Pré-DM mais jovem, informar: Idade, IMC e tratamento ao diagnóstico**

64. **Se em insulinoterapia, iniciado quanto tempo após o diagnóstico? ***

Marcar apenas uma oval.

- Sem insulinoterapia
- Imediatamente ao diagnóstico
- Dentro dos 6 primeiros meses
- Após 6 primeiros meses
- Informação não disponível

Ir para a pergunta 64.

Exames AO DIAGNÓSTICO de diabetes

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

(glicemia de jejum, Hb glicada, etc)

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não *Ir para a pergunta 73.*

Ir para a pergunta 65.

Dados laboratoriais - AO DIAGNÓSTICO DE DM - Caso Índice

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

67. **Glicemia de jejum ***

(mg/dL)

68. **Insulinemia de jejum**

(μ U/mL)

69. **Peptídeo C de jejum**

(ng/mL)

70. **Peptídeo C pós-prandial**

(ng/mL)

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

72. Hemoglobina glicada (HbA1c) *(%)

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

- Imunoturbidimetria
 HPLC

Teste de tolerância oral à glicose**74. Realizou teste de tolerância oral à glicose (curva glicêmica)? ****Marcar apenas uma oval.*

- Sim
 Não *Ir para a pergunta 76.*

Teste de tolerância oral à glicose**75. Glicemia basal (0 minutos) ***(mg/dL)

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

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

- Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 78.*
 Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 81.*
 Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 81.*

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

*Exemplo: 15 de dezembro de 2012***Anti-GAD positivo****79. Título (anti-GAD) ***(U/L)

80. Método (anti-GAD)

Marcar apenas uma oval.

- Radioimunoensaio (RIA)
- ELISA

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

Anticorpo anti-tirosina fosfatase (IA2)**82. Anticorpo anti-IA2 ***

Marcar apenas uma oval.

- Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 83.*
- Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 86.*
- Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 86.*

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Anti-IA2 positivo**84. Título (IA2) ***

(U/L)

85. Método (IA2)

Marcar apenas uma oval.

- Radioimunoensaio (RIA)
- ELISA

86. Valor de referência utilizado (IA2) *

Anticorpo anti-insulina (IAA)**87. Anticorpo anti-IAA ***

Marcar apenas uma oval.

- Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 88.*
- Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 91.*
- Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 91.*

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Anti-IAA positivo

89. **Título (IAA) ***
(U/L)

90. **Método (IAA)**

Marcar apenas uma oval.

- Radioimunoensaio (RIA)
- ELISA

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

Proteína C reativa (PCR)

92. **Dosagem (PCR) ***

Marcar apenas uma oval.

- Realizada *Ir para a pergunta 92.*
- Não realizada *Ir para a pergunta 96.*

PCR dosada

(Qualquer data disponível)

93. **Ano da realização do exame (PCR) ***

94. **Resultado (PCR) ***

(mg/L)

95. **Sensibilidade ***

Marcar apenas uma oval.

- Convencional
- Ultra sensível

96. **Valor de referência (PCR) ***

Magnésio

97. **Dosagem (Magnésio) ***

Marcar apenas uma oval.

- Realizada *Ir para a pergunta 97.*
- Não realizada *Ir para a pergunta 100.*

Magnésio dosado (Próximo ao Diagnóstico de DM)

(Qualquer data, preferencialmente a mais próxima do diagnóstico de DM)

98. Ano da realização do exame (Magnésio) *

99. Resultado (Magnésio) *

(mmol/L)

100. Valor de referência (Magnésio) *

Potássio

101. Dosagem (Potássio) *

Marcar apenas uma oval.

Realizada Ir para a pergunta 101.

Não realizada Ir para a pergunta 104.

Potássio dosado (Próximo ao Diagnóstico de DM)

(Qualquer data, preferencialmente a mais próxima do diagnóstico de DM)

102. Ano da realização do exame (Potássio) *

103. Resultado (Potássio) *

(mEq/L)

104. Valor de referência (Potássio) *

Resposta ao tratamento

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

Marcar apenas uma oval.

Sim Ir para a pergunta 105.

Não Ir para a pergunta 108.

Resposta ao tratamento

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

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

108. **Tempo necessário de tratamento para redução da HbA1c ***
 Informar número de dias ou meses ou anos
-

Peptídeo C no seguimento

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

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não *Ir para a pergunta 113.*

Dados laboratoriais APÓS 3 ANOS do diagnóstico de DM

110. **Data de realização dos exames ***

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

111. **Peptídeo C de jejum (ng/mL) ***
 (após 3 anos do diagnóstico de DM)
-

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

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

Seguimento laboratorial

114. **Possui dados laboratoriais de seguimento? ***

(ex: glicemia, HbA1c)

Marcar apenas uma oval.

- Sim *Ir para a pergunta 114.*
 Não *Ir para a pergunta 124.*

Dados laboratoriais de seguimento

(Após o início do tratamento)

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Variação da glicemia de jejum

117. **Glicemia mínima ***
(mg/dL)

118. **Glicemia máxima ***
(mg/dL)

Variação de insulinemia de jejum

119. **Insulinemia mínima**
(μ U/mL)

120. **Insulinemia máxima**
(μ U/mL)

Variação de peptídeo C de jejum

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

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

Variação de HbA1c

123. **HbA1c mínima ***
(%)

124. **HbA1c máxima ***
(%)

Complicações do diabetes

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

- Sim
- Não
- Investigação diagnóstica não realizada

127. Data da Fundoscopia

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

128. Nefropatia diabética *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não
- Investigação diagnóstica não realizada

129. Microalbuminúria (mg/g de creatinina ou mg/min ou mg/24h)

130. Data da microalbuminúria

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

131. Neuropatia diabética *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não
- Investigação diagnóstica não realizada

132. Ano da avaliação (neuropatia diabética)

133. Complicações macrovasculares *

Marque todas que se aplicam.

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

Perfil lipídico

134. Investigação do perfil lipídico *

Marcar apenas uma oval.

- Realizada *Ir para a pergunta 134.*
- Não realizada *Ir para a pergunta 140.*

Perfil lipídico e ácido úrico (Próximo ao Diagnóstico de DM)

(Qualquer data, preferencialmente a mais próxima do diagnóstico de DM)

135. **Ano da realização dos exames (perfil lipídico)**

*

136. **Colesterol total ***

(mg/dL)

137. **HDL ***

(mg/dL)

138. **LDL ***

(mg/dL)

139. **Triglicerídeos ***

(mg/dL)

140. **Ácido Úrico**

(mg/dL)

Avaliação laboratorial renal

141. **Investigação laboratorial renal ***

Marcar apenas uma oval.

Realizada *Ir para a pergunta 141.*

Não realizada *Ir para a pergunta 144.*

Avaliação laboratorial renal (Próximo ao Diagnóstico de DM)

(Qualquer data, preferencialmente a mais próxima do diagnóstico de DM)

142. **Ano da realização dos exames (perfil renal) ***

143. **Creatinina ***

(mg/dL)

144. **Uréia**

(mg/dL)

Alterações renais

145. **Presença de alterações renais anatômicas e/ou funcionais? ****Marcar apenas uma oval.*

- Sim
- Não *Ir para a pergunta 147.*
- Investigação diagnóstica não realizada *Ir para a pergunta 147.*

Alterações renais146. **Alterações renais ****Marque todas que se aplicam.*

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

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

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

Avaliação laboratorial hepática148. **Investigação laboratorial hepática ****Marcar apenas uma oval.*

- Realizada
- Não realizada *Ir para a pergunta 153.*

Perfil hepático (Próximo ao Diagnóstico de DM)

(Qualquer data, preferencialmente a mais próxima do diagnóstico de DM)

149. **Ano da realização dos exames (perfil hepático) ***

150. **TGO/AST ***

(U/L)

151. **TGP/ALT ***

(U/L)

152. FA (Fosfatase Alcalina)

(U/L)

153. Gama-GT

(U/L)

Alterações extra-pancreáticas

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

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

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

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

Outras informações

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

156. Informações adicionais

Uma cópia das suas respostas será enviada para o endereço de e-mail fornecido

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

GRUPO DE DIABETES MONOGÊNICO

Unidade de Endocrinologia Genética - LIM25 / Unidade de Diabetes

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP)

*Obrigatório

1. Endereço de e-mail *

2. Nome completo do paciente *

3. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

Masculino

Feminino

4. Registro HCFMUSP

(se disponível)

5. Telefone de contato do paciente

(DDD) número do telefone

6. Médico solicitante *

7. Telefone de contato do médico solicitante

(DDD) + número do telefone

8. CRM do médico solicitante *

9. E-mail de contato do médico solicitante *

10. Local do serviço de origem *

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

11. Data da coleta de sangue para análise genética

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

12. Cidade e Estado de nascimento *

13. Data do nascimento *

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

14. Idade atual *

(anos)

15. Idade do diagnóstico de diabetes *

(Em meses)

16. Peso ao nascimento

(g)

17. Peso ao diagnóstico *

Marcar apenas uma oval.

- Baixo peso
- Peso normal
- Sobrepeso
- Obesidade

18. Estatura ao diagnóstico

Marcar apenas uma oval.

- Estatura normal
- Baixa estatura

19. Estatura atual (cm/Z escore)

Ex.: 125 cm/-2,5 DP

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

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

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

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

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

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

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

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

Ir para a pergunta 24.

Tratamento do diabetes

25. Tratamento na época do diagnóstico de diabetes *

Marcar apenas uma oval.

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

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

Informar número de dias ou meses ou anos

27. Duração do tratamento previamente descrito *

Informar número de dias ou meses ou anos

28. Tratamento atual do diabetes *

Marcar apenas uma oval.

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

Tratamento atual do DM

Insulina

29. Tipo de insulina *

Marque todas que se aplicam.

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

30. Dose total de insulina utilizada *

(unidades/kg/dia)

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

Ir para a pergunta 36.

Tratamento atual do DM

Associação insulina + anti-diabético oral (ADO)

Insulina

32. **Tipo de insulina utilizada (associada a ADO) ***

Marque todas que se aplicam.

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

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

(unidades/dia)

34. **Tempo de uso de insulina (associada a ADO) ***

(informar se em meses ou anos)

Anti-diabéticos orais

35. **ADO(s) utilizado(s) na associação ***

Marque todas que se aplicam.

- Sulfoniluréia
 Metformina
 Inibidor de DPP4
 Outro: _____

Ir para a pergunta 36.

Tratamento atual do DM

Associações de anti-diabéticos orais (ADOs)

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

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

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

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

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

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

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

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

(pai ou mãe)

41. Idade atual (anos) *

[ou informar se falecido(a)]

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

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

43. Obesidade ou sobrepeso ao diagnóstico? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

44. Tipo de diabetes referido *

Marcar apenas uma oval.

- DM1
 DM2
 não sabe o tipo

45. Tratamento atual *

Marque todas que se aplicam.

- Insulina
 Sulfoniluréia
 Metformina
 Apenas dieta
 Outros

Histórico familiar de DM

46. Avós com DM? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim *Ir para a pergunta 46.*
 Não *Ir para a pergunta 52.*
 Não soube informar *Ir para a pergunta 52.*

Histórico familiar de DM - Avós

47. Parentesco *

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

48. Idade atual (anos) *

[ou informar se falecido(a)]

49. Idade do diagnóstico do diabetes *

Marcar apenas uma oval.

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

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

- Sim
- Não

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

- DM1
- DM2
- não sabe o tipo

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

- Insulina
- Sulfoniluréia
- Metformina
- Apenas dieta
- Outros

Histórico familiar de DM - Outros parentes diabéticos**53. Grau de parentesco dos demais familiares com DM-por favor especificar se materno ou paterno***(ex. 1 irmã e 2 tios paternos)*

*Ir para a pergunta 53.***Dados laboratoriais - AO DIAGNÓSTICO DE DIABETES - Caso Índice****54. Data aproximada da coleta para a realização dos exames laboratoriais abaixo ****Exemplo: 15 de dezembro de 2012***55. Glicemia de jejum ****(mg/dL)*

56. Insulinemia de jejum*(μ U/mL)*

57. Peptídeo C de jejum

(ng/mL)

58. Peptídeo C pós-prandial

(ng/mL)

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

HbA1c

60. Hemoglobina glicada (HbA1c) *

(%)

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

62. Glicemia basal (0 minutos)

(mg/dL)

63. Glicemia aos 120 minutos

(mg/dL)

Anticorpo anti-GAD**64. Anticorpo anti-GAD ****Marcar apenas uma oval.* Positivo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 65.* Negativo *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 68.* Não realizado *Após a última pergunta desta seção, ir para a pergunta 68.***65. Data da realização do exame (anti-GAD)**

*Exemplo: 15 de dezembro de 2012***Anti-GAD positivo**

66. **Título (anti-GAD) ***
(U/L)

67. **Método (anti-GAD)**

Marcar apenas uma oval.

- Radioimunoensaio (RIA)
- ELISA

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

Anticorpo anti-tirosina fosfatase (IA2)

69. **Anticorpo anti-IA2 ***

Marcar apenas uma oval.

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

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Anti-IA2 positivo

71. **Título (IA2) ***

(U/L)

72. **Método (IA2)**

Marcar apenas uma oval.

- Radioimunoensaio (RIA)
- ELISA

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

Anticorpo anti-insulina (IAA)

74. **Anticorpo anti-IAA ***

Marcar apenas uma oval.

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Anti-IAA positivo

76. Título (IAA) *

(U/L)

77. Método (IAA)

Marcar apenas uma oval. Radioimunoensaio (RIA) ELISA

78. Valor de referência utilizado (IAA) *

Proteína C reativa (PCR)

79. Dosagem (PCR) *

Marcar apenas uma oval. Realizada *Ir para a pergunta 79.* Não realizada *Ir para a pergunta 82.*

PCR dosada

80. Resultado (PCR) *

(mg/L)

81. Sensibilidade *

Marcar apenas uma oval. Convencional Ultra sensível

82. Valor de referência (PCR) *

Resposta ao tratamento

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

Marcar apenas uma oval. Sim *Ir para a pergunta 83.* Não *Ir para a pergunta 86.*

Resposta ao tratamento

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

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

86. Tempo necessário de tratamento para redução da HbA1c *

Informar número de dias ou meses ou anos

Seguimento laboratorial

87. Possui dados laboratoriais de seguimento? *

(ex: glicemia, HbA1c)

Marcar apenas uma oval.

Sim Ir para a pergunta 87.

Não Ir para a pergunta 100.

Dados laboratoriais de seguimento

(Após o início do tratamento)

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

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

Exemplo: 15 de dezembro de 2012

Variação da glicemia de jejum

90. Glicemia mínima *

(mg/dL)

91. Glicemia máxima *

(mg/dL)

Variação de insulinemia de jejum

92. Insulinemia mínima

(μ U/mL)

93. **Insulinemia máxima**
(μ U/mL)

Variação de peptídeo C de jejum

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

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

Peptídeo C de jejum APÓS 3 ANOS do diagnóstico

Se disponível

96. **Peptídeo C de jejum (ng/mL)**

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

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

Variação de HbA1c

99. **HbA1c mínima ***
(%)

100. **HbA1c máxima ***
(%)

Complicações do diabetes

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

- Sim
- Não
- Investigação diagnóstica não realizada

102. Fundoscopia

(em caso positivo)

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

- Sim
- Não
- Investigação diagnóstica não realizada

104. Microalbuminúria (mg/g de creatinina ou mg/min ou mg/24h)

(em caso positivo)

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

- Sim
- Não
- Investigação diagnóstica não realizada

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

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

Perfil lipídico

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

107. Investigação do perfil lipídico **Marcar apenas uma oval.*

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

Perfil lipídico e ácido úrico

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

108. Colesterol total *

(mg/dL)

109. HDL *

(mg/dL)

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

111. **Triglicerídeos ***
(mg/dL)

112. **Ácido Úrico**
(mg/dL)

Avaliação laboratorial renal

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

113. **Investigação laboratorial renal ***

Marcar apenas uma oval.

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

Avaliação laboratorial renal

(nos primeiros 2 anos após o diagnóstico de diabetes)

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

115. **Uréia**
(mg/dL)

Alterações renais

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

Marcar apenas uma oval.

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

Alterações renais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Alterações extra-pancreáticas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Análise genético-molecular

131. Informar coordenadas da variante identificada

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

Envie para mim uma cópia das minhas respostas.

Powered by
 Google Forms

ANEXO C - Critérios para pontuação/classificação de associação gene-fenótipo - ClinGen (*The NIH-funded Clinical Genome Resource*)

Tabela 1 - Classes de evidências qualitativas/genéticas e seus respectivos pesos em estudos de caso

ESTUDO DE CASO	Evidência	Característica		Pontuação Sugerida/Caso		Máximo	
				Padrão	Intervalo		
Variante	Herança Autossômica Dominante OU Ligada ao X	Variante alélica <i>de novo</i> ^a		2	0-3	12	
		Variante alélica <i>null</i> (predita ou comprovada) ^b		1,5	0-2	10	
		Variante alélica não <i>null</i> ^b com evidência de comprometimento da função gênica ^c		0,5	0-1,5	7	
	Herança Autossômica Recessiva	2 variantes alélicas <i>in trans</i> , sendo ao menos 1 <i>de novo</i> ^a OU <i>null</i> (predita ou comprovada) ^b		2	0-3	12	
		2 variantes não <i>null</i> ^b com evidência de comprometimento da função gênica ^c		1	0-1,5		
	Análise de cossegregação ^d	Evidência de cossegregação em 1 ou mais famílias	LOD Score (Exemplos)	3	5	0-7	7
				2	4		
1,5				3			
1				1,5			
PONTUAÇÃO MÁXIMA PERMITIDA PARA EVIDÊNCIAS GENÉTICAS						12	

^aA pontuação deve ser ajustada de acordo com a taxa de variantes *de novo* esperada para o gene; ^bcomo definido pelos critérios da ACMG/AMP: variante *null - nonsense / frameshift / em sítio canônico de splicing (± 1 ou 2) / códon inicial / deleções de éxons*; ^cevidência de comprometimento da função gênica baseada em dados computacionais e preditivos devem pontuar valor menor do que o padrão estabelecido (0,5), enquanto que aquela baseada em estudos funcionais podem pontuar valor acima do padrão (0,5), respeitando o limite máximo (1,5/caso) a depender da qualidade e representatividade biológica do ensaio realizado; ^dvalor de LOD Score estimado, segundo modelo proposto pela publicação, utilizando o número de meioses informativas para uma variante alélica rara e um fenótipo com elevada penetrância com fenocópias raras ou ausentes; LOD: *logarithm of the odds* (logaritmo da probabilidade).

Tabela 2 - Classes de evidências semiquantitativas/experimentais e seus respectivos pesos

Evidência	Tipo	Pontuação Sugerida		Máximo
		Padrão	Intervalo	
Função	Função bioquímica ^a	0,5	0-2	2
	Interação proteica ^b		0-2	
	Expressão ^c		0-2	
Alteração funcional	Células de indivíduos afetados ^d	1	0-2	2
	Edição gênica ^e	0,5	0-1	
Modelos/Recuperação (<i>in vivo/in vitro</i>)	Modelo animal ^f	2	0-4	4
	Modelo em cultura celular ^f	1	0-2	
	Recuperação com modelo animal ^g	2	0-4	
	Recuperação com engenharia celular ^g	1	0-2	
PONTUAÇÃO MÁXIMA PERMITIDA PARA EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS				6

^aFunção bioquímica: função bioquímica similar ao do produto proteico de um gene já relacionado ao fenótipo investigado E/OU função do produto proteico é consistente com o fenótipo investigado; ^binteração proteica: interação molecular com o produto proteico de um gene já relacionado ao fenótipo investigado; ^cexpressão: expressão gênica em tecido relevante para o fenótipo investigado E/OU expressão gênica alterada em indivíduos com o fenótipo investigado; ^ddemonstração de comprometimento da função do produto gênico em indivíduos com variantes alélicas candidatas; ^edemonstração de comprometimento da função do produto gênico em células carreadoras de variantes alélicas candidatas frutos de edição gênica; ^fmodelo animal ou cultura celular com cópia comprometida (ou similar) do gene candidato apresentando características consistentes com aquelas observadas em humanos com o fenótipo investigado; ^grecuperação do fenótipo em células derivadas de indivíduos afetados ou fruto de engenharia gênica após adição de produto gênico selvagem.

Tabela 3 - Modelo para cálculo de LOD Score estimado

Herança Autossômica Dominante/Ligada ao X												
n	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4
LOD	4,5	4,2	3,9	3,6	3,3	3,0	2,7	2,4	2,1	1,8	1,5	1,2
Pontuação	6,5	6,0	5,5	5,5	5,0	5,0	4,5	4,0	4,0	3,5	3,0	1,5
Herança Autossômica Recessiva												
x/y	7/4	7/1	6/1	5/1	4/3	4/1	3/3	3/2	3/1	2/3	2/2	2/1
LOD	4,11	3,73	3,14	2,53	2,18	1,90	1,50	1,45	1,30	1,00	0,85	0,72
Pontuação	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,5	1,5	1,0	1,0

n: número de meioses informativas no modelo de herança autossômica dominante/ligada ao X; x/y: número de indivíduos afetados / número de portadores não afetados no modelo de herança autossômica recessiva; LOD: *logarithm of the odds* (logaritmo da probabilidade).

Tabela 4 - Resumo da classificação de associação gene-fenótipo baseada no *framework* proposto pelo ClinGen (*The NIH-funded Clinical Genome Resource*)

Evidência		Pontuação/Descrição
Evidências corroborativas	Definitiva	12-18 ^a
	Forte	12-18
	Moderada	7-11
	Limitada	1-6
Evidências inexistentes		Relatos inexistentes de uma relação causal entre o gene e o fenótipo investigado. Gene pode ser considerado “candidato”

^aReplicado ao longo do tempo: mais de 3 anos desde o primeiro relato de associação do gene com o fenótipo investigado E mais de 2 relatos de indivíduos afetados com variantes alélicas no gene avaliado.

ANEXO D - Critérios para classificação da patogenicidade de variantes alélicas - *The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP)*

Evidência	Categoria	
Patogenicidade		
Muito forte	PVS1	Variante que comprometa completamente a função proteica (<i>null</i>) em um gene cuja perda de função (LOF) é um mecanismo de doença conhecido - <i>nonsense</i> / <i>frameshift</i> / deleções de éxons / localizada em sítio canônico de <i>splicing</i> (± 1 ou 2) ou no códon de iniciação .
Forte	PS1	Mesma alteração de aminoácido que uma variante antes descrita como patogênica, independentemente da troca de nucleotídeos.
	PS2	Variante <i>de novo</i> (com paternidade e maternidade confirmadas).
	PS3	Estudos funcionais (<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>) que demonstrem um efeito deletério da variante no gene ou em seu produto.
	PS4	A prevalência da variante em indivíduos afetados é maior do que a observada em controles.
Moderada	PM1	Variante localizada em um <i>hot spot</i> e, ou um domínio proteico importante em que não foram mapeadas variantes frequentes.
	PM2	Variante ausente em controles (ou em uma frequência extremamente baixa - doenças recessivas) em bases de dados genômicos como <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1.000 Genomes Project</i> ou <i>Exome Aggregation Consortium</i> .
	PM3	Variante detectada em <i>trans</i> com uma variante patogênica (modelo recessivo de herança).
	PM4	Modificação do tamanho do produto proteico em consequência de deleções/inserções <i>in-frame</i> em uma região não repetitiva ou variantes do tipo <i>stop-loss</i> .
	PM5	Nova variante <i>missense</i> em uma posição (resíduo) em que outra variante <i>missense</i> já foi descrita como patogênica.
	PM6	Variante <i>de novo</i> (sem paternidade e maternidade confirmadas).
Corroborante	PP1*	Cossegregação com a doença em inúmeros membros afetados de uma família em um gene definitivamente conhecido como causador do fenótipo.
	PP2	Variantes <i>missense</i> em um gene que possui baixas taxas de variantes <i>missense</i> benignas e no qual esse tipo de variante é um mecanismo comum de doença.
	PP3	Análise <i>in silico</i> da variante em preditores indica um comprometimento do gene ou de seu produto.
	PP4	Fenótipo do paciente ou história familiar é altamente específica para uma doença com uma única etiologia genética.
	PP5	Fontes confiáveis relataram à variante, recentemente, como patogênica .

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

*Pode ser utilizado como evidência moderada ou forte com o aumento dos dados de cossegregação (indivíduos rastreados) (101); LOF: *loss of function*.

10 REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 2019;42(Supplement 1):S1–193.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Diabetes Report Card 2012. 2012.
3. Organização Pan-Americana da Saúde. Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil. 2017. 32 p.
4. Groop L, Pociot F. Genetics of diabetes - Are we missing the genes or the disease? *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jan 25;382(1):726–39.
5. Shields BM, Shepherd M, Hudson M, McDonald TJ, Colclough K, Peters J, et al. Population-Based Assessment of a Biomarker-Based Screening Pathway to Aid Diagnosis of Monogenic Diabetes in Young-Onset Patients. *Diabetes Care*. 2017 Aug 12;40(8):1017–25.
6. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care*. 2019 Jan 17;42(Supplement 1):S13–28.
7. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2017 Jan 15;40(Supplement 1):S11–24.
8. Rubio-Cabezas O, Hattersley AT, Njølstad PR, Mlynarski W, Ellard S, White N, et al. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2014 Sep;15(S20):47–64.
9. Flannick J, Johansson S, Njølstad PR. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. *Nat Rev Endocrinol*. 2016 Jul 15;12(7):394–406.
10. 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 Mar 18;19(1):35–52.
11. Fajans SS, Conn JW. Tolbutamide-induced Improvement in Carbohydrate Tolerance of Young People with Mild Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 1960 Mar 1;9(2):83–8.
12. Tattersall RB, Fajans SS. A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes*. 1975 Jan;24(1):44–53.
13. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *N Engl J Med*. 2001 Sep 27;345(13):971–80.
14. Lachance C-H. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. *Can J Diabetes*. 2016 Oct;40(5):368–75.
15. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Dechaume A, Huyvaert M, Montagne L, et al. Whole-Exome Sequencing and High Throughput Genotyping Identified KCNJ11 as the Thirteenth MODY Gene. Brusgaard K, editor. *PLoS One*. 2012 Jun 11;7(6):e37423.
16. Bowman P, Flanagan SE, Edghill EL, Damhuis A, Shepherd MH, Paisey R, et al. Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. *Diabetologia*. 2012 Jan 12;55(1):123–7.
17. Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A, Ludovico O, Buranasupkajorn P, Mazza T, et al.

- Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus. *Am J Hum Genet.* 2015 Jul 2;97(1):177–85.
18. Flannick J, Beer NL, Bick AG, Agarwala V, Molnes J, Gupta N, et al. Assessing the phenotypic effects in the general population of rare variants in genes for a dominant Mendelian form of diabetes. *Nat Genet.* 2013 Nov 6;45(11):1380–5.
 19. Sanyoura M, Philipson LH, Naylor R. Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options. *Curr Diab Rep.* 2018 Aug 22;18(8):58.
 20. Hattersley AT, Greeley SAW, Polak M, Rubio-Cabezas O, Njølstad PR, Mlynarski W, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2018 Oct;19 Suppl 2:47–63.
 21. Naylor R, Philipson LH. Who should have genetic testing for maturity-onset diabetes of the young? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011 Oct;75(4):422–6.
 22. Caetano LA, Santana LS, Costa-Riquetto AD, Lerario AM, Nery M, Nogueira GF, et al. PDX1 -MODY and dorsal pancreatic agenesis: New phenotype of a rare disease. *Clin Genet.* 2018 Feb 1;93(2):382–6.
 23. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia.* 2010 Dec 25;53(12):2504–8.
 24. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, et al. Beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes.* 2001 Feb 1;50(Supplement 1):S94–100.
 25. Santana LS, Caetano LA, Costa-Riquetto AD, Quedas EPS, Nery M, Collett-Solberg P, et al. Clinical application of ACMG-AMP guidelines in HNF1A and GCK variants in a cohort of MODY families. *Clin Genet.* 2017 Oct 7;92(4):388–96.
 26. Shepherd M, Ellis I, Ahmad AM, Todd PJ, Bowen-Jones D, Mannion G, et al. Predictive genetic testing in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med.* 2001 May;18(5):417–21.
 27. Fajans SS, Bell GI. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care.* 2011 Aug 25;34(8):1878–84.
 28. 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.
 29. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia.* 2008 Apr;51(4):546–53.
 30. Furuzawa GK, Giuffrida FMA, Oliveira CSV, Chacra AR, Dib S a, Reis AF. Low prevalence of MODY2 and MODY3 mutations in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008 Sep;81(3):e12–4.
 31. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas.* 8th ed. 2017. 150 p.
 32. Giuffrida FMA, Moises RS, Weinert LS, Calliari LE, Manna T Della, Dotto RP, et al. Maturity-onset diabetes of the young (MODY) in Brazil: Establishment of a national registry and appraisal of available genetic and clinical data. *Diabetes Res Clin Pract.*

- 2017 Jan;123:134–42.
33. Maraschin J de F, Kannengiesser C, Murussi N, Campagnolo N, Canani LH, Gross JL, et al. HNF1 α mutations are present in half of clinically defined MODY patients in South-Brazilian individuals. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Nov;52(8):1326–31.
 34. Moises RS, Reis AF, Morel V, Chacra AR, Dib SA, Bellanne-Chantelot C, et al. Prevalence of Maturity-Onset Diabetes of the Young Mutations in Brazilian Families With Autosomal- Dominant Early-Onset Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Apr 1;24(4):786–8.
 35. de Santana LS, Caetano LA, Costa-Riquetto AD, Franco PC, Dotto RP, Reis AF, et al. Targeted sequencing identifies novel variants in common and rare MODY genes. *Mol Genet genomic Med*. 2019 Dec 8;7(12):e962.
 36. Gloyn AL. Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum Mol Genet*. 2005 Feb 24;14(7):925–34.
 37. Babenko AP, Polak M, Cavé H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, et al. Activating Mutations in the ABCC8 Gene in Neonatal Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 2006 Aug 3;355(5):456–66.
 38. Edghill EL, Flanagan SE, Patch A-MA-M, Boustred C, Parrish A, Shields B, et al. Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. *Diabetes*. 2008 Apr 1;57(4):1034–42.
 39. Støy J, Greeley SAW, Paz VP, Ye H, Pastore AN, Skowron KB, et al. Diagnosis and treatment of neonatal diabetes: an United States experience†. *Pediatr Diabetes*. 2008 Oct;9(5):450–9.
 40. Russo L, Iafusco D, Brescianini S, Nocerino V, Bizzarri C, Toni S, et al. Permanent diabetes during the first year of life: multiple gene screening in 54 patients. *Diabetologia*. 2011 Jul 10;54(7):1693–701.
 41. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating Mutations in the Gene Encoding the ATP-Sensitive Potassium-Channel Subunit Kir6.2 and Permanent Neonatal Diabetes. *N Engl J Med*. 2004 Apr 29;350(18):1838–49.
 42. Liu M, Sun J, Cui J, Chen W, Guo H, Barbetti F, et al. INS-gene mutations: From genetics and beta cell biology to clinical disease. *Mol Aspects Med*. 2015 Apr;42(4):3–18.
 43. Ellard S, Lango Allen H, De Franco E, Flanagan SE, Hysenaj G, Colclough K, et al. Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing. *Diabetologia*. 2013 Sep 15;56(9):1958–63.
 44. Cortés VA, Fernández-Galilea M. Lipodystrophies: adipose tissue disorders with severe metabolic implications. *J Physiol Biochem*. 2015 Sep 2;71(3):471–8.
 45. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic β -cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Apr 26;4(4):200–13.
 46. Schouten JP. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):57e – 57.

47. Colclough K, Saint-Martin C, Timsit J, Ellard S, Bellanné-Chantelot C. Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *Eur J Hum Genet*. 2014 Sep 12;22(9):1153–1153.
48. Patni N, Garg A. Congenital generalized lipodystrophies—new insights into metabolic dysfunction. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Aug 4;11(9):522–34.
49. De Franco E, Ellard S. Genome, Exome, and Targeted Next-Generation Sequencing in Neonatal Diabetes. *Pediatr Clin North Am*. 2015 Aug;62(4):1037–53.
50. Alkorta-Aranburu G, Carmody D, Cheng YW, Nelakuditi V, Ma L, Dickens JT, et al. Phenotypic heterogeneity in monogenic diabetes: The clinical and diagnostic utility of a gene panel-based next-generation sequencing approach. *Mol Genet Metab*. 2014 Dec 28;113(4):315–20.
51. Ellard S, De Franco E. Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Monogenic Diabetes and Discovery of Novel Aetiologies. In 2014. p. 71–86.
52. Santos de Santana L, Costa-Riquetto AD, Franco PC, Alcântara AEE, Teles MG. Identification of novel variants in genes associated with neonatal diabetes in a Brazilian cohort. *Pediatr Diabetes*. 2019 Oct 29;20(S28):175.
53. Cardoso GC, de Oliveira MZ, Paixão-Côrtés VR, Castilla EE, Schuler-Faccini L. Clusters of genetic diseases in Brazil. *J Community Genet*. 2019 Jan 2;10(1):121–8.
54. Garg A, Kircher M, Del Campo M, Amato RS, Agarwal AK, University of Washington Center for Mendelian Genomics. Whole exome sequencing identifies de novo heterozygous *CAV1* mutations associated with a novel neonatal onset lipodystrophy syndrome. *Am J Med Genet A*. 2015 Aug;167A(8):1796–806.
55. Dusatkova P, Fang M, Pruhova S, Gjesing AP, Cinek O, Hansen T, et al. Lessons from whole-exome sequencing in *MODYX* families. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Jun;104(3):e72-4.
56. Santana LS de, Caetano LA, Jorge AAL, Teles MG. Questionário eletrônico para *MODY*: otimização da coleta de dados. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2014;58((supl 3)):S125.
57. Dotto RP, Santana LS de, Lindsey SC, Caetano LA, Franco LF, Moisés RCMS, et al. Searching for mutations in the *HNF1B* gene in a Brazilian cohort with renal cysts and hyperglycemia. *Arch Endocrinol Metab*. 2019 Apr 26;63(3):250–7.
58. Costa-Riquetto AD. Análise genético-molecular por sequenciamento paralelo em larga escala de portadores das formas raras de diabetes monogênico e lipodistrofias hereditárias. Universidade de São Paulo; 2018.
59. Franco PC, de Santana LS, Santomauro Junior AC, Jorge AA de L, Teles MG. Searching for overlooked genetic defects by reanalyzing data from massively parallel sequencing in patients with monogenic diabetes. In: *Precision Diabetes Medicine*. Virtual Conference: American Diabetes Association; 2021.
60. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 2018;41(1):S1–155.
61. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of *MODY* in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia*. 2012 May 5;55(5):1265–

- 72.
62. Thanabalasingham G, Pal A, Selwood MP, Dudley C, Fisher K, Bingley PJ, et al. Systematic Assessment of Etiology in Adults With a Clinical Diagnosis of Young-Onset Type 2 Diabetes Is a Successful Strategy for Identifying Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Diabetes Care*. 2012 Jun 1;35(6):1206–12.
 63. Doria A, Yang Y, Malecki M, Scotti S, Dreyfus J, O’Keeffe C, et al. Phenotypic characteristics of early-onset autosomal-dominant type 2 diabetes unlinked to known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes. *Diabetes Care*. 1999 Feb 1;22(2):253–61.
 64. Weintrob N, Stern E, Klipper-Aurbach Y, Phillip M, Gat-Yablonski G. Childhood obesity complicating the differential diagnosis of maturity-onset diabetes of the young and type 2 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2008 Feb 23;9(1):60–4.
 65. McDonald TJ, Colclough K, Brown R, Shields B, Shepherd M, Bingley P, et al. Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2011 Sep;28(9):1028–33.
 66. Hiatt SM, Amaral MD, Bowling KM, Finnila CR, Thompson ML, Gray DE, et al. Systematic reanalysis of genomic data improves quality of variant interpretation. *Clin Genet*. 2018 Jul;94(1):174–8.
 67. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.
 68. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1996 Nov 1;242(1):84–9.
 69. Illumina I. *bcl2fastq and bcl2fastq2 Conversion Software*. San Diego; 2019.
 70. Blankenberg D, Gordon A, Von Kuster G, Coraor N, Taylor J, Nekrutenko A. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*. 2010 Jul 15;26(14):1783–5.
 71. Andrew S. *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data* [Internet]. Babraham: The Babraham Institute; 2016. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 72. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009 Jul 15;25(14):1754–60.
 73. Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing [Internet]. 2012 [cited 2016 Mar 19]. p. 9. Available from: <http://arxiv.org/abs/1207.3907>
 74. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep 1;38(16):e164–e164.
 75. Giardine B. Galaxy: A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res*. 2005 Sep 16;15(10):1451–5.
 76. Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, et al. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol*. 2010 Jan;Chapter 19:Unit 19.10.1-21.

77. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 2010 Jan 25;11(8):R86.
78. Najmi LA, Aukrust I, Flannick J, Molnes J, Burtt N, Molven A, et al. Functional Investigations of HNF1A Identify Rare Variants as Risk Factors for Type 2 Diabetes in the General Population. *Diabetes.* 2017 Feb;66(2):335–46.
79. Lemelman MB, Letourneau L, Greeley SAW. Neonatal Diabetes Mellitus: An Update on Diagnosis and Management. *Clin Perinatol.* 2018;45(1):41–59.
80. Stelzer G, Plaschkes I, Oz-Levi D, Alkelai A, Olender T, Zimmerman S, et al. VarElect: the phenotype-based variation prioritizer of the GeneCards Suite. *BMC Genomics.* 2016 Jun 23;17(S2):444.
81. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020 May 28;581(7809):434–43.
82. Tadaka S, Hishinuma E, Komaki S, Motoike IN, Kawashima J, Saigusa D, et al. jMorp updates in 2020: large enhancement of multi-omics data resources on the general Japanese population. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D536–44.
83. Scott EM, Halees A, Itan Y, Spencer EG, He Y, Azab MA, et al. Characterization of Greater Middle Eastern genetic variation for enhanced disease gene discovery. *Nat Genet.* 2016;48(9):1071–6.
84. GenomeAsia100K Consortium. The GenomeAsia 100K Project enables genetic discoveries across Asia. *Nature.* 2019;576(7785):106–11.
85. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* 2017 Jul;38(7):751–63.
86. Fattahi Z, Beheshtian M, Mohseni M, Poustchi H, Sellars E, Nezhadi SH, et al. Iranome: A catalog of genomic variations in the Iranian population. *Hum Mutat.* 2019;40(11):1968–84.
87. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4).
88. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell.* 2019 Jan 24;176(3):535–548.e24.
89. Jian X, Boerwinkle E, Liu X. In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2014 Dec 16;42(22):13534–44.
90. Firth H V., Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009 Apr;84(4):524–33.
91. Belinky F, Nativ N, Stelzer G, Zimmerman S, Iny Stein T, Safran M, et al. PathCards: multi-source consolidation of human biological pathways. *Database (Oxford).* 2015 Jan 1;2015.
92. Bult CJ, Blake JA, Smith CL, Kadin JA, Richardson JE, Anagnostopoulos A, et al.

- Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D801–6.
93. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D1005–12.
 94. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinforma.* 2016 Jun 20;54(1):1.30.1-1.30.33.
 95. Fadista J, Manning AK, Florez JC, Groop L. The (in)famous GWAS P-value threshold revisited and updated for low-frequency variants. *Eur J Hum Genet.* 2016 Aug 6;24(8):1202–5.
 96. Smith CL, Eppig JT. The mammalian phenotype ontology: enabling robust annotation and comparative analysis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009 Nov 13;1(3):390–9.
 97. Schriml LM, Arze C, Nadendla S, Chang Y-WW, Mazaitis M, Felix V, et al. Disease Ontology: a backbone for disease semantic integration. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan 1;40(D1):D940–6.
 98. Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH, Ceyhan-Birsoy O, DiStefano M, Dwight SS, et al. Evaluating the Clinical Validity of Gene-Disease Associations: An Evidence-Based Framework Developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet.* 2017 Jun 1;100(6):895–906.
 99. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May 5;17(5):405–23.
 100. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet.* 2016 Jun 2;98(6):1077–81.
 101. Maffei S, Di Renzo M, Bova G, Auteri A, Pasqui AL. Takayasu's arteritis: a review of the literature. *Intern Emerg Med.* 2006 Jul;1(2):105–12.
 102. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998 Mar;8(3):186–94.
 103. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res.* 1998 Mar 1;8(3):175–85.
 104. Wang J, Raskin L, Samuels DC, Shyr Y, Guo Y. Genome measures used for quality control are dependent on gene function and ancestry. *Bioinformatics.* 2015 Feb 1;31(3):318–23.
 105. Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature.* 1992 Apr 23;356(6371):721–2.
 106. 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 Mar;432(5):1535–50.
 107. Shim YJ, Kim JE, Hwang S-K, Choi BS, Choi BH, Cho E-M, et al. Identification of Candidate Gene Variants in Korean MODY Families by Whole-Exome Sequencing.

- Horm Res Paediatr. 2015;83:242–51.
108. Stankute I, Verkauskiene R, Blouin J-L, Klee P, Dobrovolskiene R, Danyte E, et al. Systematic Genetic Study of Youth With Diabetes in a Single Country Reveals the Prevalence of Diabetes Subtypes, Novel Candidate Genes, and Response to Precision Therapy. *Diabetes*. 2020 May;69(5):1065–71.
 109. Berberich AJ, Wang J, Cao H, McIntyre AD, Spaic T, Miller DB, et al. Simplifying Detection of Copy-Number Variations in Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Can J Diabetes*. 2021 Feb;45(1):71–7.
 110. Weedon MN, Cebola I, Patch A-M, Flanagan SE, De Franco E, Caswell R, et al. Recessive mutations in a distal PTF1A enhancer cause isolated pancreatic agenesis. *Nat Genet*. 2014 Jan;46(1):61–4.
 111. Gasperikova D, Tribble ND, Stanik J, Huckova M, Misovicova N, van de Bunt M, et al. Identification of a Novel β -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 Aug 1;58(8):1929–35.
 112. Godart F, Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Gragnoli C, Abderrahmani A, Blanché H, et al. Identification of seven novel nucleotide variants in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (TCF1) promoter region in MODY patients. *Hum Mutat*. 2000 Feb;15(2):173–80.
 113. Allen HL, Flanagan SE, Shaw-Smith C, De Franco E, Akerman I, Caswell R, et al. GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet*. 2012 Jan 11;44(1):20–2.
 114. Catli G, Abaci A, Flanagan SE, De Franco E, Ellard S, Hattersley A, et al. A novel GATA6 mutation leading to congenital heart defects and permanent neonatal diabetes: A case report. *Diabetes Metab*. 2013 Sep;39(4):370–4.
 115. Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell M a, Caswell R, Allen HL, De Franco E, et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat Genet*. 2014 Jul 20;46(8):812–4.
 116. Milner JD, Vogel TP, Forbes L, Ma CA, Stray-Pedersen A, Niemela JE, et al. Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood*. 2015 Jan 22;125(4):591–9.
 117. Cordeddu V, Redeker B, Stellacci E, Jongejan A, Fragale A, Bradley TEJ, et al. Mutations in ZBTB20 cause Primrose syndrome. *Nat Genet*. 2014 Aug 13;46(8):815–7.
 118. Johnson MB, De Franco E, Lango Allen H, Al Senani A, Elbarbary N, Siklar Z, et al. Recessively Inherited LRBA Mutations Cause Autoimmunity Presenting as Neonatal Diabetes. *Diabetes*. 2017 Aug;66(8):2316–22.
 119. STANIK J, SKOPKOVA M, STANIKOVA D, BRENNEROVA K, BARAK L, TICHA L, et al. Neonatal Hypoglycemia, Early-Onset Diabetes and Hypopituitarism Due to the Mutation in EIF2S3 Gene Causing MEHMO Syndrome. *Physiol Res*. 2018 Apr 30;67(2):331–7.
 120. Skopkova M, Hennig F, Shin B-S, Turner CE, Stanikova D, Brennerova K, et al. EIF2S3 Mutations Associated with Severe X-Linked Intellectual Disability Syndrome MEHMO. *Hum Mutat*. 2017 Apr;38(4):409–25.

121. De Franco E, Watson RA, Weninger WJ, Wong CC, Flanagan SE, Caswell R, et al. A Specific CNOT1 Mutation Results in a Novel Syndrome of Pancreatic Agenesis and Holoprosencephaly through Impaired Pancreatic and Neurological Development. *Am J Hum Genet.* 2019;104(5):985–9.
122. Kruszka P, Berger SI, Weiss K, Everson JL, Martinez AF, Hong S, et al. A CCR4-NOT Transcription Complex, Subunit 1, CNOT1, Variant Associated with Holoprosencephaly. *Am J Hum Genet.* 2019;104(5):990–3.
123. Yalçın Çapan Ö, Aydın N, Yılmaz T, Berber E. Whole exome sequencing reveals novel candidate gene variants for MODY. *Clin Chim Acta.* 2020 Nov;510:97–104.
124. Li J, Sun S, Wang X, Li Y, Zhu H, Zhang H, et al. A Missense Mutation in IRS1 is Associated with the Development of Early-Onset Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol.* 2020 Jan 25;2020:1–8.
125. Cheon CK, Lee YJ, Yoo S, Lee JH, Lee JE, Kim HJ, et al. Delineation of the genetic and clinical spectrum, including candidate genes, of monogenic diabetes: a multicenter study in South Korea. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2020 Dec 16;33(12):1539–50.
126. Song A, Lu L, Li Y, Lin M, Yuan X, Cheng X, et al. Low HbA1c With Normal Hemoglobin in a Diabetes Patient Caused by PIEZO1 Gene Variant: A Case Report. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Jun 19;11:356.
127. Zhong L, Zhao Z, Hu Q, Li Y, Zhao W, Li C, et al. Identification of Maturity-Onset Diabetes of the Young Caused by Mutation in FOXM1 via Whole-Exome Sequencing in Northern China. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Feb 9;11:534362.
128. Kim S-H, Kim M, Yim J, Kim M, Jang D-H. Transient Neonatal Diabetes Mellitus in SHORT Syndrome: A Case Report. *Front Pediatr.* 2021 Jun 23;9:650920.
129. Al-Fadhli FM, Afqi M, Sairafi MH, Almuntashri M, Alharby E, Alharbi G, et al. Biallelic loss of function variant in the unfolded protein response gene PDIA6 is associated with asphyxiating thoracic dystrophy and neonatal-onset diabetes. *Clin Genet.* 2021 May 17;99(5):694–703.
130. Micheline S, Ricci M, Serrani R, Barati S, Kenanoglu S, Veselenyiova D, et al. NOTCH1: Review of its role in lymphatic development and study of seven families with rare pathogenic variants. *Mol Genet genomic Med.* 2021 Jan 28;9(1):e1529.
131. Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D884–91.
132. Rosati E, Baldoni S, De Falco F, Del Papa B, Dorillo E, Rompietti C, et al. NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Oncol.* 2018 Jun 27;8:229.
133. Page DJ, Miossec MJ, Williams SG, Monaghan RM, Fotiou E, Cordell HJ, et al. Whole Exome Sequencing Reveals the Major Genetic Contributors to Nonsyndromic Tetralogy of Fallot. *Circ Res.* 2019 Feb 15;124(4):553–63.
134. Li HJ, Kapoor A, Giel-Moloney M, Rindi G, Leiter AB. Notch signaling differentially regulates the cell fate of early endocrine precursor cells and their maturing descendants in the mouse pancreas and intestine. *Dev Biol.* 2012 Nov 15;371(2):156–69.
135. Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* 1995 Apr 15;9(8):1009–19.

136. Naya FJ, Huang H-P, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 1997 Sep 15;11(18):2323–34.
137. Demirbilek H, Hatipoglu N, Gul U, Tatli ZU, Ellard S, Flanagan SE, et al. Permanent neonatal diabetes mellitus and neurological abnormalities due to a novel homozygous missense mutation in NEUROD1. *Pediatr Diabetes.* 2018 Aug;19(5):898–904.
138. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 1999 Nov;23(3):323–8.
139. Hald J, Hjorth JP, German MS, Madsen OD, Serup P, Jensen J. Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate endocrine development. *Dev Biol.* 2003 Aug 15;260(2):426–37.
140. Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Dec 9;100(25):14920–5.
141. Debiec R, Hamby SE, Jones PD, Coolman S, Asiani M, Kharodia S, et al. Novel loss of function mutation in NOTCH1 in a family with bicuspid aortic valve, ventricular septal defect, thoracic aortic aneurysm, and aortic valve stenosis. *Mol Genet genomic Med.* 2020;8(10):e1437.
142. Vandersteen AM, Dixon JW. Adams–Oliver syndrome, a family with dominant inheritance and a severe phenotype. *Clin Dysmorphol.* 2011 Oct;20(4):210–3.
143. Yamada Y, Sakuma J, Takeuchi I, Yasukochi Y, Kato K, Oguri M, et al. Identification of five genetic variants as novel determinants of type 2 diabetes mellitus in Japanese by exome-wide association studies. *Oncotarget.* 2017 Oct 6;8(46):80492–505.
144. Kopinke D, Brailsford M, Shea JE, Leavitt R, Scaife CL, Murtaugh LC. Lineage tracing reveals the dynamic contribution of Hes1 + cells to the developing and adult pancreas. *Development.* 2011 Feb 1;138(3):431–41.
145. Wang T, Zheng L, Wang Q, Hu Y-W. Emerging roles and mechanisms of FOXC2 in cancer. *Clin Chim Acta.* 2018 Apr;479:84–93.
146. Birkenkamp KU, Coffey PJ. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans.* 2003 Feb;31(Pt 1):292–7.
147. Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene.* 2008 Apr 7;27(16):2276–88.
148. Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene.* 2008 Apr 7;27(16):2263–75.
149. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinforma.* 2016;54:1.30.1-1.30.33.
150. Cederberg A, Grønning LM, Ahrén B, Taskén K, Carlsson P, Enerbäck S. FOXC2 Is a Winged Helix Gene that Counteracts Obesity, Hypertriglyceridemia, and Diet-Induced Insulin Resistance. *Cell.* 2001 Sep 7;106(5):563–73.
151. Hader C, Marlier A, Cantley L. Mesenchymal–epithelial transition in epithelial response to injury: the role of Foxc2. *Oncogene.* 2010 Feb 23;29(7):1031–40.

152. Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, et al. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Jun 12;104(24):10069–74.
153. Medina-Trillo C, Aroca-Aguilar J-D, Ferre-Fernández J-J, Alexandre-Moreno S, Morales L, Méndez-Hernández C-D, et al. Role of FOXC2 and PITX2 rare variants associated with mild functional alterations as modifier factors in congenital glaucoma. Anderson MG, editor. *PLoS One*. 2019 Jan 18;14(1):e0211029.
154. Missaglia S, Tavian D, Michelini S, Maltese PE, Bonanomi A, Bertelli M. Imbalance between Expression of FOXC2 and Its lncRNA in Lymphedema-Distichiasis Caused by Frameshift Mutations. *Genes (Basel)*. 2021 Apr 27;12(5):650.
155. Yildirim-Toruner C, Subramanian K, El Manjra L, Chen E, Goldstein S, Vitale E. A novel frameshift mutation of FOXC2 gene in a family with hereditary lymphedema-distichiasis syndrome associated with renal disease and diabetes mellitus. *Am J Med Genet*. 2004 Dec 15;131A(3):281–6.
156. Nian X, Zhang X, Wang Y, Li H, Li J, Liu H, et al. Correlations of FOXC2 Gene Expression and Polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Lab*. 2016;62(05/2016):781–91.
157. Yanagisawa K, Hingstrup Larsen L, Andersen G, Drivsholm T, Cederberg A, Westergren R, et al. The FOXC2 -512C>T variant is associated with hypertriglyceridaemia and increased serum C-peptide in Danish Caucasian glucose-tolerant subjects. *Diabetologia*. 2003 Nov 1;46(11):1576–80.
158. Pappa KI, Gazouli M, Economou K, Daskalakis G, Anastasiou E, Anagnou NP, et al. Gestational diabetes mellitus shares polymorphisms of genes associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Greek population. *Gynecol Endocrinol*. 2011 Apr;27(4):267–72.
159. Shaat N, Lernmark Å, Karlsson E, Ivarsson S, Parikh H, Berntorp K, et al. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2007 Apr 5;50(5):972–9.
160. Kovacs P, Lehn-Stefan A, Stumvoll M, Bogardus C, Baier LJ. Genetic Variation in the Human Winged Helix/Forkhead Transcription Factor Gene FOXC2 in Pima Indians. *Diabetes*. 2003 May 1;52(5):1292–5.
161. Carlsson E, Groop L, Ridderstråle M. Role of the FOXC2 -512C>T polymorphism in type 2 diabetes: possible association with the dysmetabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Mar 14;29(3):268–74.
162. Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T, Kato K, et al. Systematic Search for Single Nucleotide Polymorphisms in the FOXC2 Gene: The Absence of Evidence for the Association of Three Frequent Single Nucleotide Polymorphisms and Four Common Haplotypes With Japanese Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2003 Feb 1;52(2):562–7.
163. Saint-Martin C, Bouvet D, Bellanné-Chantelot C. Analysis of Patients with Monogenic Diabetes Brings to Light Genes Associated With Syndromic Presentations. In: *Precision Diabetes Medicine 2021*. 2021. p. Virtual Conference.
164. Colcough K, Ellard S, Hattersley A, Patel K. Syndromic Monogenic Diabetes Genes Should Be Analysed in Patients with Suspected MODY. In: *Precision Diabetes Medicine*

2021. 2021. p. Virtual Conference.
165. Storjohann L, Holst B, Schwartz TW. Molecular mechanism of Zn²⁺ agonism in the extracellular domain of GPR39. *FEBS Lett.* 2008 Jul 23;582(17):2583–8.
 166. Egerod KL, Holst B, Petersen PS, Hansen JB, Mulder J, Hökfelt T, et al. GPR39 Splice Variants Versus Antisense Gene LYPD1: Expression and Regulation in Gastrointestinal Tract, Endocrine Pancreas, Liver, and White Adipose Tissue. *Mol Endocrinol.* 2007 Jul 1;21(7):1685–98.
 167. Popovics P, Stewart AJ. GPR39: a Zn²⁺-activated G protein-coupled receptor that regulates pancreatic, gastrointestinal and neuronal functions. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Jan 2;68(1):85–95.
 168. Holst B, Egerod KL, Jin C, Petersen PS, Østergaard MV, Hald J, et al. G Protein-Coupled Receptor 39 Deficiency Is Associated with Pancreatic Islet Dysfunction. *Endocrinology.* 2009 Jun 1;150(6):2577–85.
 169. Bateman A, Martin M-J, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D480–9.
 170. Tremblay F, Richard A-MT, Will S, Syed J, Stedman N, Perreault M, et al. Disruption of G Protein-Coupled Receptor 39 Impairs Insulin Secretion in Vivo. *Endocrinology.* 2009 Jun 1;150(6):2586–95.
 171. Tremblay F, Perreault M, Klaman LD, Tobin JF, Smith E, Gimeno RE. Normal Food Intake and Body Weight in Mice Lacking the G Protein-Coupled Receptor GPR39. *Endocrinology.* 2007 Feb 1;148(2):501–6.
 172. Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, et al. Cloning and Characterization of a Novel Mammalian Zinc Transporter, Zinc Transporter 5, Abundantly Expressed in Pancreatic β Cells. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):19049–55.
 173. Maret W. Zinc in Pancreatic Islet Biology, Insulin Sensitivity, and Diabetes. *Prev Nutr Food Sci.* 2017 Mar 31;22(1):1–8.
 174. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Oct 23;104(43):17040–5.
 175. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat Rev Genet.* 2018 Sep 22;19(9):581–90.
 176. Calcaterra V, Martinetti M, Salina A, Aloisi C, Larizza D. The coexistence of type 1 diabetes, MODY2 and metabolic syndrome in a young girl. *Acta Diabetol.* 2012 Oct 18;49(5):401–4.
 177. Goumenos A, Tsoutsou E, Traeger-Synodinos J, Petychakis D, Gavra M, Kolialexi A, et al. Two novel variants in the TCF12 gene identified in cases with craniosynostosis. *Appl Clin Genet.* 2019 Feb;Volume 12:19–25.
 178. Massari ME, Murre C. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol Cell Biol.* 2000 Jan 15;20(2):429–40.
 179. Crowe DT, Tsai MJ. Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region defines sequences important for expression in HIT cells. *Mol Cell Biol.* 1989 Apr;9(4):1784–9.

180. Whelan J, Poon D, Weil PA, Stein R. Pancreatic beta-cell-type-specific expression of the rat insulin II gene is controlled by positive and negative cellular transcriptional elements. *Mol Cell Biol*. 1989 Aug;9(8):3253–9.
181. Rubio-Cabezas O, Minton JAL, Kantor I, Williams D, Ellard S, Hattersley AT. Homozygous mutations in NEUROD1 are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities. *Diabetes*. 2010 Sep;59(9):2326–31.
182. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: A Matching Tool for Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Hum Mutat*. 2015 Oct;36(10):928–30.
183. Del Dotto V, Fogazza M, Lenaers G, Rugolo M, Carelli V, Zanna C. OPA1: How much do we know to approach therapy? *Pharmacol Res*. 2018;131:199–210.
184. Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. *Physiol Rev*. 2009 Jul;89(3):799–845.
185. Belenguer P, Pellegrini L. The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria? *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1833(1):176–83.
186. Stenson PD, Mort M, Ball E V, Chapman M, Evans K, Azevedo L, et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Hum Genet*. 2020 Oct;139(10):1197–207.
187. Zhang Z, Wakabayashi N, Wakabayashi J, Tamura Y, Song W-J, Sereda S, et al. The dynamin-related GTPase Opa1 is required for glucose-stimulated ATP production in pancreatic beta cells. *Shaw JM, editor. Mol Biol Cell*. 2011 Jul 1;22(13):2235–45.
188. Delettre-Cribaillet C, Hamel CP, Lenaers G. Optic Atrophy Type 1. In: *GeneReviews® [Internet]*. Seattle (WA): University of Washington [Updated 2015 Nov 12]; 2007.
189. Cherif Titah SM, Meunier I, Blanchet C, Lopez S, Rondouin G, Lenaers G, et al. Cataract as a Phenotypic Marker for a Mutation in WFS1 , the Wolfram Syndrome Gene. *Eur J Ophthalmol*. 2012 Mar 18;22(2):254–8.
190. El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, Dent J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. 2014 Jun;63(6):871–80.
191. Clarrett DM, Hachem C. Gastroesophageal Reflux Disease (GERD). *Mo Med*. 115(3):214–8.
192. Nasca A, Rizza T, Doimo M, Legati A, Ciolfi A, Diodato D, et al. Not only dominant, not only optic atrophy: expanding the clinical spectrum associated with OPA1 mutations. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 Dec 12;12(1):89.
193. Bonneau D, Colin E, Oca F, Ferré M, Chevrollier A, Guéguen N, et al. Early-onset Behr syndrome due to compound heterozygous mutations in OPA1. *Brain*. 2014 Oct;137(10):e301–e301.
194. Kazamel M, Wong L-J, Milone M. Novel OPA1 mutation featuring spastic paraparesis and intestinal dysmotility. *Mol Genet Metab Reports*. 2014;1:443–5.
195. Amatya B, Lee H, Asico LD, Konkalmatt P, Armando I, Felder RA, et al. SNX-PXA-RGS-PXC Subfamily of SNXs in the Regulation of Receptor-Mediated Signaling and Membrane Trafficking. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 26;22(5).

196. Hu YF, Zhang HL, Cai T, Harashima S, Notkins AL. The IA-2 interactome. *Diabetologia*. 2005 Dec 5;48(12):2576–81.
197. Harashima S-I, Horiuchi T, Wang Y, Notkins AL, Seino Y, Inagaki N. Sorting nexin 19 regulates the number of dense core vesicles in pancreatic β -cells. *J Diabetes Investig*. 2012 Feb 20;3(1):52–61.
198. Olsson AH, Volkov P, Bacos K, Dayeh T, Hall E, Nilsson EA, et al. Genome-Wide Associations between Genetic and Epigenetic Variation Influence mRNA Expression and Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. Greally JM, editor. *PLoS Genet*. 2014 Nov 6;10(11):e1004735.
199. Harashima S-I, Harashima C, Nishimura T, Hu Y, Notkins AL. Overexpression of the autoantigen IA-2 puts beta cells into a pre-apoptotic state: autoantigen-induced, but non-autoimmune-mediated, tissue destruction. *Clin Exp Immunol*. 2007 Aug 28;150(1):49–60.
200. Muller YL, Hanson RL, Knowler WC, Fleming J, Goswami J, Huang K, et al. Identification of genetic variation that determines human trehalase activity and its association with type 2 diabetes. *Hum Genet*. 2013 Jun 7;132(6):697–707.
201. Rutter GA, Pullen TJ, Hodson DJ, Martinez-Sanchez A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochem J*. 2015 Mar 1;466(2):203–18.
202. Klotz L-O, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:51–72.
203. Psenakova K, Kohoutova K, Obsilova V, Ausserlechner M, Veverka V, Obsil T. Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics. *Cells*. 2019 Aug 24;8(9):966.
204. Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T. Phosphorylation of Serine 256 by Protein Kinase B Disrupts Transactivation by FKHR and Mediates Effects of Insulin on Insulin-like Growth Factor-binding Protein-1 Promoter Activity through a Conserved Insulin Response Sequence. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):17184–92.
205. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 May;16(4):183–9.
206. Chahal J, Chen C-C, Rane MJ, Moore JP, Barati MT, Song Y, et al. Regulation of Insulin-Response Element Binding Protein-1 in Obesity and Diabetes: Potential Role in Impaired Insulin-Induced Gene Transcription. *Endocrinology*. 2008 Oct 1;149(10):4829–36.
207. Nakae J, Biggs WH, Kitamura T, Cavenee WK, Wright CVE, Arden KC, et al. Regulation of insulin action and pancreatic β -cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet*. 2002 Oct 3;32(2):245–53.
208. Qu S, Altomonte J, Perdomo G, He J, Fan Y, Kamagate A, et al. Aberrant Forkhead Box O1 Function Is Associated with Impaired Hepatic Metabolism. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5641–52.
209. Müssig K, Staiger H, Machicao F, Stančáková A, Kuusisto J, Laakso M, et al. Association of Common Genetic Variation in the FOXO1 Gene with β -Cell Dysfunction, Impaired Glucose Tolerance, and Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Apr 1;94(4):1353–60.

210. Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH, Wright CVE, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. *J Clin Invest*. 2002 Dec 15;110(12):1839–47.
211. Chen H, Jawahar S, Qian Y, Duong Q, Chan G, Parker A, et al. Missense polymorphism in the human carboxypeptidase E gene alters enzymatic activity. *Hum Mutat*. 2001 Aug;18(2):120–31.
212. Ji L, Wu H-T, Qin X-Y, Lan R. Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles in disease. *Endocr Connect*. 2017 May;6(4):R18–38.
213. Cheng Y, Cawley NX, Yanik T, Murthy SRK, Liu C, Kasikci F, et al. A human carboxypeptidase E/NF- α 1 gene mutation in an Alzheimer's disease patient leads to dementia and depression in mice. *Transl Psychiatry*. 2016 Dec 6;6(12):e973–e973.
214. Vasiljević J, Torkko JM, Knoch K-P, Solimena M. The making of insulin in health and disease. *Diabetologia*. 2020 Oct 7;63(10):1981–9.
215. Kawasaki E. ZnT8 and type 1 diabetes [Review]. *Endocr J*. 2012;59(7):531–7.
216. Mains RE, Eipper BA. Peptides. In: *Basic Neurochemistry*. Elsevier; 2012. p. 390–407.
217. Arolas J, Vendrell J, Aviles F, Fricker L. Metalloproteases: Emerging Drug Targets in Biomedicine. *Curr Pharm Des*. 2007 Feb 1;13(4):349–66.
218. Jeffrey KD, Alejandro EU, Luciani DS, Kalynyak TB, Hu X, Li H, et al. Carboxypeptidase E mediates palmitate-induced -cell ER stress and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Jun 17;105(24):8452–7.
219. Alsters SIM, Goldstone AP, Buxton JL, Zekavati A, Sosinsky A, Yiorkas AM, et al. Truncating Homozygous Mutation of Carboxypeptidase E (CPE) in a Morbidly Obese Female with Type 2 Diabetes Mellitus, Intellectual Disability and Hypogonadotropic Hypogonadism. Cota D, editor. *PLoS One*. 2015 Jun 29;10(6):e0131417.
220. Durmaz A, Aykut A, Atik T, Özen S, Ayyıldız Emecen D, Ata A, et al. A New Cause of Obesity Syndrome Associated with a Mutation in the Carboxypeptidase Gene Detected in Three Siblings with Obesity, Intellectual Disability and Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2021 Feb 26;13(1):52–60.
221. Coleman DL, Eicher EM. Fat (fat) and Tubby (tubby): Two Autosomal Recessive Mutations Causing Obesity Syndromes in the Mouse. *J Hered*. 1990 Nov;81(6):424–7.
222. Gomez P, Hallberg L, Greeley Jr. GH. Carboxypeptidase E (CPE) Deficiency in Mice with the Fat Mutation Have Reduced Stomach Function. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Jan 3;220(1):52–3.
223. Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, et al. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet*. 1995 Jun;10(2):135–42.
224. Ardestani A, Paroni F, Azizi Z, Kaur S, Khobragade V, Yuan T, et al. MST1 is a key regulator of beta cell apoptosis and dysfunction in diabetes. *Nat Med*. 2014 Apr 16;20(4):385–97.
225. Leitao LCA, Ismail AM, Fahlman RP. The expanding complexity of the phosphorylation and proteolytic signaling axis of MST1. *Biotarget*. 2018 May;2:9–9.
226. Ardestani A, Li S, Annamalai K, Lypse B, Geravandi S, Dobrowolski A, et al. Neratinib

- protects pancreatic beta cells in diabetes. *Nat Commun.* 2019 Dec 1;10(1):5015.
227. Johnson JD, Ahmed NT, Luciani DS, Han Z, Tran H, Fujita J, et al. Increased islet apoptosis in Pdx1^{+/-} mice. *J Clin Invest.* 2003 Apr 15;111(8):1147–60.
 228. Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, Gannon M, Knobel SM, Piston DW, et al. Reduction in Pancreatic Transcription Factor PDX-1 Impairs Glucose-stimulated Insulin Secretion. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11225–32.
 229. Hallmann K, Kudin AP, Zsurka G, Kornblum C, Reimann J, Stüve B, et al. Loss of the smallest subunit of cytochrome c oxidase, COX8A, causes Leigh-like syndrome and epilepsy. *Brain.* 2016 Feb 1;139(2):338–45.
 230. Hock DH, Reljic B, Ang C-S, Muellner-Wong L, Mountford HS, Compton AG, et al. HIGD2A is Required for Assembly of the COX3 Module of Human Mitochondrial Complex IV. *Mol Cell Proteomics.* 2020 Jul;19(7):1145–60.
 231. Soto IC, Fontanesi F, Liu J, Barrientos A. Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2012 Jun;1817(6):883–97.
 232. Weksler-Zangen S, Aharon-Hananel G, Mantzur C, Aouizerat T, Gurgul-Convey E, Raz I, et al. IL-1 β hampers glucose-stimulated insulin secretion in Cohen diabetic rat islets through mitochondrial cytochrome c oxidase inhibition by nitric oxide. *Am J Physiol Metab.* 2014 Mar 15;306(6):E648–57.
 233. Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M, et al. A Mutation of COX6A1 Causes a Recessive Axonal or Mixed Form of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Am J Hum Genet.* 2014 Sep 4;95(3):294–300.
 234. Massa V, Fernandez-Vizarra E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I, et al. Severe Infantile Encephalomyopathy Caused by a Mutation in COX6B1, a Nucleus-Encoded Subunit of Cytochrome C Oxidase. *Am J Hum Genet.* 2008 Jun;82(6):1281–9.
 235. Shteyer E, Saada A, Shaag A, Al-Hijawi FA, Kidess R, Revel-Vilk S, et al. Exocrine Pancreatic Insufficiency, Dyserythropoietic Anemia, and Calvarial Hyperostosis Are Caused by a Mutation in the COX4I2 Gene. *Am J Hum Genet.* 2009 Mar;84(3):412–7.
 236. Indrieri A, van Rahden VA, Tiranti V, Morleo M, Iaconis D, Tammaro R, et al. Mutations in COX7B Cause Microphthalmia with Linear Skin Lesions, an Unconventional Mitochondrial Disease. *Am J Hum Genet.* 2012 Nov 2;91(5):942–9.
 237. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997 Nov 6;390(6655):45–51.
 238. Xu Y, Sun Z. Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging. *Endocr Rev.* 2015 Apr 1;36(2):174–93.
 239. Saar-Kovrov V, Donners MMPC, van der Vorst EPC. Shedding of Klotho: Functional Implications in Chronic Kidney Disease and Associated Vascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2021 Jan 28;7.
 240. Cheikhi A, Barchowsky A, Sahu A, Shinde SN, Pius A, Clemens ZJ, et al. Klotho: An Elephant in Aging Research. *Journals Gerontol Ser A.* 2019 Jun 18;74(7):1031–42.
 241. Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem.* 2005 Nov

- 11;280(45):38029–34.
242. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y-I. Klotho, a Gene Related to a Syndrome Resembling Human Premature Aging, Functions in a Negative Regulatory Circuit of Vitamin D Endocrine System. *Mol Endocrinol*. 2003 Dec 1;17(12):2393–403.
 243. Rakugi H, Matsukawa N, Ishikawa K, Yang J, Imai M, Ikushima M, et al. Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine*. 2007 Jun 27;31(1):82–7.
 244. Imai M, Ishikawa K, Matsukawa N, Kida I, Ohta J, Ikushima M, et al. Klotho Protein Activates the PKC Pathway in the Kidney and Testis and Suppresses 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase Gene Expression. *Endocrine*. 2004 Dec;25(3):229–34.
 245. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 20;339(3):827–32.
 246. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, et al. Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. *Science* (80-). 2007 Aug 10;317(5839):803–6.
 247. Lin Y, Sun Z. Antiaging Gene Klotho Enhances Glucose-Induced Insulin Secretion by Up-Regulating Plasma Membrane Levels of TRPV2 in MIN6 β -Cells. *Endocrinology*. 2012 Jul 1;153(7):3029–39.
 248. Lin Y, Sun Z. In Vivo Pancreatic β -Cell-Specific Expression of Antiaging Gene Klotho : A Novel Approach for Preserving β -Cells in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2015 Apr;64(4):1444–58.
 249. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, et al. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest*. 2007 Sep 4;117(9):2684–91.
 250. Ramnitz M, Gafni R, Collins M. Hyperphosphatemic Familial Tumoral Calcinosis. In: *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington; 2018.
 251. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2015 Nov 17;44(D1):D862-8.
 252. Utsugi T, Ohno T, Ohyama Y, Uchiyama T, Saito Y, Matsumura Y, et al. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism*. 2000 Sep;49(9):1118–23.
 253. Mori K, Yahata K, Mukoyama M, Suganami T, Makino H, Nagae T, et al. Disruption of klotho Gene Causes an Abnormal Energy Homeostasis in Mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Nov 30;278(3):665–70.
 254. Nessa A, Rahman SA, Hussain K. Hyperinsulinemic Hypoglycemia - The Molecular Mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7(March):29.
 255. McNiven MA, Razidlo GL. Regulation of Cell Migration. In: *Encyclopedia of Cell Biology*. Elsevier; 2016. p. 208–15.
 256. Fernández-Medarde A, Santos E. The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2011 Apr;1815(2):170–88.

257. Font de Mora J. Ras-GRF1 signaling is required for normal β -cell development and glucose homeostasis. *EMBO J*. 2003 Jun 16;22(12):3039–49.
258. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren J-M, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998 Feb 26;391(6670):900–4.
259. Rane SG, Dubus P, Mettus R V, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, et al. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nat Genet*. 1999 May;22(1):44–52.
260. Pende M, Kozma SC, Jaquet M, Oorschot V, Burcelin R, Le Marchand-Brustel Y, et al. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished β -cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*. 2000 Dec;408(6815):994–7.
261. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):167–80.
262. Arozarena I, Aaronson DS, Matallanas D, Sanz V, Ajenjo N, Tenbaum SP, et al. The Rho Family GTPase Cdc42 Regulates the Activation of Ras/MAP Kinase by the Exchange Factor Ras-GRF. *J Biol Chem*. 2000 Aug 25;275(34):26441–8.
263. Anborgh PH, Qian X, Papageorge AG, Vass WC, DeClue JE, Lowy DR. Ras-Specific Exchange Factor GRF: Oligomerization through Its Dbl Homology Domain and Calcium-Dependent Activation of Raf. *Mol Cell Biol*. 1999 Jul;19(7):4611–22.
264. Freshney NW, Goonesekera SD, Feig LA. Activation of the exchange factor Ras-GRF by calcium requires an intact Dbl homology domain. *FEBS Lett*. 1997 Apr 21;407(1):111–5.
265. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocr Rev*. 2001 Apr 1;22(2):153–83.
266. Deshmukh HA, Madsen AL, Viñuela A, Have CT, Grarup N, Tura A, et al. Genome-Wide Association Analysis of Pancreatic Beta-Cell Glucose Sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021 Jan 1;106(1):80–90.
267. Shi X, Zhao Y, Fan C. Zbed3 promotes proliferation and invasion of lung cancer partly through regulating the function of Axin-Gsk3 β complex. *J Cell Mol Med*. 2019 Feb;23(2):1014–21.
268. Liu H, Shi X, Fan X, Zhang D, Jiang B, Zhao Y, et al. The function of BED finger domain of Zbed3 in regulating lung cancer cell proliferation. *J Cell Biochem*. 2019 Aug 25;120(8):12340–7.
269. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017 Jun 1;169(6):985–99.
270. Hu W, Tian B, Li X, Li L, Zhang L, Liu H, et al. Circulating Zbed3 Levels in Subjects With and Without Metabolic Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2017 Jun;15(5):207–12.
271. Uhl GR, Martinez MJ. PTPRD: neurobiology, genetics, and initial pharmacology of a pleiotropic contributor to brain phenotypes. *Ann N Y Acad Sci*. 2019 Sep 15;1451(1):112–29.
272. Peyser ND, Du Y, Li H, Lui V, Xiao X, Chan TA, et al. Loss-of-Function PTPRD Mutations Lead to Increased STAT3 Activation and Sensitivity to STAT3 Inhibition in

- Head and Neck Cancer. Tao Q, editor. PLoS One. 2015 Aug 12;10(8):e0135750.
273. Yan H, Shi Z, Wu Y, Xiao J, Gu Q, Yang Y, et al. Targeted next generation sequencing in 112 Chinese patients with intellectual disability/developmental delay: novel mutations and candidate gene. BMC Med Genet. 2019 Dec 14;20(1):80.
 274. Bateman A, Martin M-J, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D480–9.
 275. Chagnon MJ, Uetani N, Tremblay ML. Functional significance of the LAR receptor protein tyrosine phosphatase family in development and diseases. Biochem Cell Biol. 2004 Dec 1;82(6):664–75.
 276. Ren JM, Li PM, Zhang WR, Sweet LJ, Cline G, Shulman GI, et al. Transgenic mice deficient in the LAR protein-tyrosine phosphatase exhibit profound defects in glucose homeostasis. Diabetes. 1998 Mar 1;47(3):493–7.
 277. Batt J, Asa S, Fladd C, Rotin D. Pituitary, Pancreatic and Gut Neuroendocrine Defects in Protein Tyrosine Phosphatase- Sigma-Deficient Mice. Mol Endocrinol. 2002 Jan 1;16(1):155–69.
 278. Wood AR, Jonsson A, Jackson AU, Wang N, van Leewen N, Palmer ND, et al. A Genome-Wide Association Study of IVGTT-Based Measures of First-Phase Insulin Secretion Refines the Underlying Physiology of Type 2 Diabetes Variants. Diabetes. 2017 Aug;66(8):2296–309.
 279. Imamura M, Iwata M, Maegawa H, Watada H, Hirose H, Tanaka Y, et al. Replication study for the association of rs391300 in SRR and rs17584499 in PTPRD with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. J Diabetes Investig. 2013 Mar 18;4(2):168–73.
 280. Shim YJ, Kim JE, Hwang S-K, Choi BS, Choi BH, Cho E-M, et al. Identification of Candidate Gene Variants in Korean MODY Families by Whole-Exome Sequencing. Horm Res Paediatr. 2015 Mar 7;83(4):242–51.
 281. Östenson C-G, Sandberg-Nordqvist A-C, Chen J, Hällbrink M, Rotin D, Langel Ü, et al. Overexpression of Protein-Tyrosine Phosphatase PTP σ Is Linked to Impaired Glucose-Induced Insulin Secretion in Hereditary Diabetic Goto-Kakizaki Rats. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 8;291(4):945–50.



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: 5

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: 3.318.157

Apresentação do Projeto:

Trata-se da inclusão de um subprojeto de Doutorado de título "ESTUDO DO EXOMA EM FAMÍLIAS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) E DIABETES MELLITUS NEONATAL" do aluno Lucas Santos de Santana ao projeto aprovado "Determinação da Base Molecular de Pacientes Portadores de Diabetes Monogênico". Os pesquisadores vão realizar o sequenciamento exômico (Whole Exome Sequencing) de pacientes clinicamente diagnosticados com MODY e Diabetes Mellitus Neonatal, que possuam exame genético prévio negativo para alterações em todos os genes já descritos associados ao seu respectivo fenótipo. As amostras que serão utilizadas no estudo foram coletadas em protocolo anterior previamente aprovado. O subprojeto é pertinente ao protocolo aprovado e irá contribuir para complementação do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo dos pesquisadores neste subprojeto é a avaliação do Exoma em famílias com diagnóstico Clínico de Mody(Maturity-Onset Diabetes of the Young) e Diabetes Mellitus Neonatal) que será o projeto de Doutorado do aluno Lucas Santos de Santana. O desenho do estudo está adequado e será relevante na especialidade médica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O protocolo proposto não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa.

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



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3.318.157

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de relevância na especialidade médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado para o desenvolvimento do estudo.

Recomendações:

Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

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_BÁSICAS_1321949_E4.pdf	26/03/2019 11:42:27		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 Lilian_back.JPG	30/09/2013 10:18:06		Aceito
Outros	Adendo Plataforma Brasil Lilian.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



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3.318.157

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, 10 de Maio de 2019

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

**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

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: Santana LS, Caetano LA, Costa-Riquetto AD, Franco PC, Dotto RP, Reis AF, et al. *Targeted sequencing identifies novel variants in common and rare MODY genes*. Mol Genet Genomic Med. 2019 Oct 8;7(12):e962





Received: 15 November 2018 | Revised: 9 August 2019 | Accepted: 13 August 2019

DOI: 10.1002/mgg3.962

ORIGINAL ARTICLE

Molecular Genetics & Genomic Medicine  WILEY

Targeted sequencing identifies novel variants in common and rare MODY genes

Lucas S. de Santana¹  | Lilian A. Caetano^{1,2}  | Aline D. Costa-Riquetto^{1,2} | Pedro C. Franco^{1,2} | Renata P. Dotto³ | André F. Reis³ | Letícia S. Weinert⁴ | Sandra P. Silveiro⁴ | Marcio F. Vendramini⁵ | Flaviane A. do Prado⁶ | Giovanna C. P. Abrahão⁷ | Ana Gregória F. P. de Almeida⁸ | Maria da G. Rodrigues Tavares⁹ | Wagner Rodrigo B. Gonçalves¹⁰ | Augusto C. Santomauro Junior¹¹ | Bruno Halpern¹² | Alexander A. L. Jorge¹  | Marcia Nery² | Milena G. Teles^{1,2} 

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

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

³Departamento de Medicina, Disciplina de Endocrinologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, SP, Brazil

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

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

⁶Hospital Regional de Taguatinga da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, Taguatinga, DF, Brazil

⁷Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUCSP), Sao Paulo, SP, Brazil

⁸Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Sao Luis, MA, Brazil

⁹Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Sao Luis, MA, Brazil

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

¹¹Serviço de Endocrinologia Prof. Dr. Fadlo Fraige Filho, Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo (BP-SP), Sao Paulo, SP, Brazil

¹²Departamento de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Sao Paulo, SP, Brazil

Correspondence

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

Funding information

Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) grants #2013/19920-2 and #2017/15365-5 awarded to MGT, #2017/14703-4 awarded to LSS, #2015/05123-9 awarded to AFR, and #2013/02162-8 awarded to Multiusuário SELA (School of Medicine, University of Sao Paulo—USP). National Council for Scientific and

Abstract

Background: Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a form of monogenic diabetes with autosomal dominant inheritance. To date, mutations in 11 genes have been frequently associated with this phenotype. In Brazil, few cohorts have been screened for MODY, all using a candidate gene approach, with a high prevalence of undiagnosed cases (MODY-X).

Methods: We conducted a next-generation sequencing target panel (tNGS) study to investigate, for the first time, a Brazilian cohort of MODY patients with a negative prior genetic analysis. One hundred and two patients were selected, of which 26 had an initial clinical suspicion of MODY-*GCK* and 76 were non-*GCK* MODY.

Results: After excluding all benign and likely benign variants and variants of uncertain significance, we were able to assign a genetic cause for 12.7% (13/102) of the probands. Three

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2019 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

Mol Genet Genomic Med. 2019;00:e962.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.962>

wileyonlinelibrary.com/journal/mgg3 | 1 of 17