



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ DUQUE DE CAXIAS
PROFESSOR GERALDO CIDADE**

**VALIDÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE
SANGER COMO MÉTODO MOLECULAR DE DIAGNOSTICO DE
CASOS DE DIABETES DO TIPO MODY-HNF1A**

Jennifer de Amorim Müller do Vale

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ DUQUE DE CAXIAS
PROFESSOR GERALDO CIDADE

Implementação de um método de sequenciamento de DNA
para o diagnóstico molecular de casos de diabetes do tipo MODY-HNF1A

Jennifer de Amorim Müller do Vale

Monografia apresentada ao curso de
Ciências Biológicas: Biotecnologia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus Duque de Caxias Professor
Geraldo Cidade, como requisito necessário
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Orientadora: Ana Carolina P. da Fonseca

Duque de Caxias
2023

Implementação de um método de sequenciamento de DNA
para o diagnóstico molecular de casos de diabetes do tipo MODY-HNF1A

Jennifer de Amorim Müller do Vale

Monografia apresentada ao curso de
Ciências Biológicas: Biotecnologia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus Duque de Caxias Professor
Geraldo Cidade, como requisito necessário
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Orientadora: Ana Carolina P. da Fonseca

Aprovada em ____ de _____ de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a.Dr^a. Ana Carolina P. da Fonseca
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Prof. Dr Kaio Cezar Rodrigues Salum (Membro externo)
Hospital Clementino Fraga Filho - UFRJ

Prof. Dr Kleber Luiz de Araujo e Souza (Membro interno da banca)
Professor Adjunto Campus Duque de Caxias – UFRJ

Prof^a. Dr^a Ana Paula Santos da Silva de Oliveira (Revisora e suplente)
Professora Adjunta Campus Duque, de Caxias – UFRJ

Dedicatória

Á todas as mulheres e meninas que
sonham. *“Fear does not deserve your
attention.”*

Agradecimento

A Deus, por todas as oportunidades e por toda proteção.

Agradeço primeiramente a minha família. Mesmo que eu tente, não conseguiria expressar toda minha gratidão e amor por vocês.

Aos meus pais, Aline e Felipe, por me ensinar o que é o amor sem limites e incondicional. Obrigada por serem um pilar na minha vida e me apoiarem sempre. Obrigada por me fazerem alcançar voos altos e lindos, mas sempre com o conforto do retorno. Obrigada por serem a melhor e maior inspiração da minha vida.

A minha mãe, Aline Amorim, por todos os sorrisos e preocupações. Por todo apoio, palavras sinceras, exemplos e aprendizado. Obrigada pelas suas particularidades que te tornam a melhor mãe que eu poderia ter.

Ao meu pai, Felipe Müller, agradeço por tanta inspiração, amor, apoio e leveza. Sua amizade, carinho e presença tornam a minha vida mais bela, levarei isso para toda vida.

A minha irmã e melhor amiga, Giovanna Müller, por ser tanta luz na minha vida. Obrigada por me ensinar e estar sempre comigo. Nosso amor transborda. A vida é muito mais linda desde que você nasceu.

A Leona, por sempre me proporcionar alegria e carinho da forma mais pura.

A minha avó, Neusa Oliveira (em memória), que me deu incontáveis sorrisos ao dizer que teria uma neta “doutora”. Obrigada pelo seu amor genuíno.

Aos meus avós Jorge Ferreira e Mercedes Müller, por todo amor, cuidado e apoio de sempre e em todos os momentos. É incrível crescer com avós tão cuidados ao lado.

Ao meu padrinho, Alex Müller, por ser tão amigo, inspirador, incentivador e carinhoso. A minha tia Renata Müller, por ser um exemplo. A eles, Yuri e Kyara, por todo amor e carinho em forma de abraços e sorrisos.

A Larissa Gabriela, por ter me ensinado o valor de ter uma irmã de outra mãe. Por todo cuidado, parceria, companhia, conforto, sorrisos e ensinamentos.

Aos meus amigos da NeoAtom, por terem me ensinado muito sobre trabalho em equipe e amizade.

Às minhas amigas do ensino médio e da vida, Lorena Galhano, Vitória Luiza e Júlia Krusemark, por estarem sempre presentes, entregando muito carinho, apoio e sorrisos. Me deixa em êxtase ver que depois do ensino médio, cada uma seguiu seu caminho, mas continuamos todas juntas em um só coração. Minha enche de alegria ver cada uma, com seu jeitinho, preenchendo minha vida de amor e alegria. Obrigada por suas características e presença, vocês são as melhores amigas que eu poderia ter.

Ao meu tio André Müller, por todo apoio e amor, mesmo que a nove mil quilômetros de distância física. É um prazer acompanhar suas conquistas e ver sua torcida pelas minhas. *Miss u*

Ao meu tio Bruno Amorim por todo apoio e carinho. O riocard que patrocinou muitas idas ao fundão e Fiocruz nunca será esquecido.

A minha madrinha, Bruna Amorim, por todo carinho, apoio e brincadeiras que sempre me arrancam um sorriso.

Aos meus familiares, em geral, que sempre me tratam muito bem e me dão forças.

A instituição Frei Luiz e seus trabalhadores que me ajudaram em um dos momentos mais desafiadores da minha graduação. Gostaria de agradecer, em especial, ao Arnaldo.

Aos meus amigos do Bacharelado em Biotecnologia. A Lorena Rezende, obrigada por ser tão parceira, obrigada pela sua amizade. A Manuella Furtado, obrigada por estar até o último minuto do último trabalho, foi um prazer dividir a academia com você.

A Juliana, Mayte, Marianna, Lilian, Anne, e Igor, a companhia de vocês tornou a graduação ainda melhor. Ao Marco, Danilo e Luísa por todas as corridas para pegar os ônibus.

Ao Vinícius Fernandes, por todas as risadas, companhia incrível e caronas que sempre salvaram. Jamais me esquecerei de como foi divertido ficar perdida com você dentro de Santa Cruz da Serra para buscar donuts para o simpósio. Ao Leonardo Lago, por todas as risadas, parceria e companhia que tornaram a graduação muito melhor. Obrigada pela amizade de vocês.

Ao professor Marcel Lyra, por ter sido um orientador de coração. Obrigada por todas as oportunidades e por cada ajuda. São imensuráveis os aprendizados que tive ao longo da graduação ao participar de projetos com você, como a monitoria, o Hora Ciência e o Caxias é Live. Obrigada por somar tanto na minha formação.

Aos professores Robson Roney, Teresa Calegari, Silas Pessini, Bianca Pizzorno, Joana Ramos e Jasmin, por terem sido professores que marcaram minha trajetória na graduação de forma positiva. Jamais me esquecerei.

A professora Ana Paula Santos, minha orientadora de graduação e vida. Obrigada por cada conversa que acalmou meu coração. Obrigada por cada dica, conselho e orientação. Minha trajetória na UFRJ se tornou muito mais fácil e agradável com a sua presença.

As amigas do LGH, Amanda e Cléo. Obrigada por tornarem o dia a dia no laboratório ainda mais prazeroso. Sentirei falta das nossas conversas e de dividir as capelas com vocês.

Ao Mario Campos, gostaria de agradecer por ter me proporcionado tanto conhecimento e experiências. Obrigada por ter aberto as portas do LGH para mim.

A Ritiele Bastos, que muito me ensinou e apoiou durante a minha passagem no LGH. A Amanda, Camila, Verônica, por juntas terem proporcionado uma boa experiência e ensinamentos no LGH.

A professora Ana Carolina Proença, por ter introduzido a genética na minha vida, me indicado o LGH e ter sido a melhor orientadora que eu poderia ter tido. Foi uma das melhores experiências acadêmicas que tive. Muito obrigada!

A Fiocruz por ter sido palco das minhas pesquisas.

A UFRJ, por todos os recursos e oportunidades.

A cada um que passou pela minha vida nestes cinco anos de graduação, obrigada por sua contribuição.

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica e metabólica. Sua principal característica é apresentar hiperglicemia nos portadores desta doença, causando sintomas que ocasionam a piora da sua qualidade de vida. Os sintomas podem variar de acordo com os tipos de DM e sua origem. As causas mais comuns são as multifatoriais, como a diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1), diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) e diabetes *mellitus* gestacional (DMG). Essas, encontradas na maioria dos indivíduos com DM, resultam nos sintomas mais conhecidos da doença, como a fome, sede exacerbada, perda de peso, fadiga, visão turva e micção frequente. Além destas mais comuns, há as formas monogênicas de DM, que são aquelas onde apenas um gene alterado é capaz de trazer esta condição ao portador. A forma de DM monogênica estudada para este trabalho foi a *Maturity-onset diabetes of Young*, conhecida por poder apresentar diferentes genes como causa. Para este estudo, investigamos o gene *HNF1A*, analisando seu efeito na diabetes tipo MODY. Assim, foi desenvolvido um método de sequenciamento de DNA para o diagnóstico molecular de casos de DM do tipo MODY-*HNF1A*. O objetivo é que haja a implementação deste método, visando a importância do diagnóstico correto e rápido para a vida dos pacientes. Para isso, foi implementado para este estudo testes de sequenciamento genético, o sequenciamento de Sanger, para buscar de maneira minuciosa o diagnóstico dos pacientes. Como resultado, obtivemos sucesso na maioria dos éxons sequenciados, o que nos permite realizar uma leitura limpa e clara para diagnosticar esses pacientes de forma mais certa. Por fim, foi discutida toda a importância de obter um diagnóstico correto para que o tratamento seja mais eficiente, melhorando a qualidade de vida dos pacientes portadores de Diabetes *Mellitus* tipo MODY.

Palavras-chave: Genes, Diabetes *Mellitus*, Teste genético, MODY, Sequenciamento.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is a chronic and metabolic disease. Its main characteristic is to present hyperglycemia in patients with this disease, causing symptoms that lead to a worsening of their quality of life. Symptoms may vary according to the types of DM and their origin. The most common causes are multifactorial, such as type 1 diabetes (DM1), type 2 diabetes (DM2) and gestational diabetes (GDM). These, being the most common, result in the most known symptoms of the disease, such as exacerbated hunger and thirst, weight loss, fatigue, blurred vision and frequent urination. In addition to these more common ones, there are the monogenic forms of diabetes, which are those where only an altered gene is capable of bringing this condition to the bearer. The form of monogenic diabetes studied for this work was MODY diabetes *mellitus*. The *Maturity-onset diabetes of young* is currently known to have different genes as a cause. For this study, we studied the HNF1A gene, analyzing its effect on MODY type diabetes. In this work, a DNA sequencing method was developed for the molecular diagnosis of cases of MODY-HNF1A diabetes. The objective is to implement this method, aiming at the importance of a correct and quick diagnosis for the lives of patients. For this reason, genetic sequencing tests, the Sanger sequencing, were implemented for this study in order to search in detail for the diagnosis of patients. As a result, we were successful in most of the sequenced exons, allowing us to perform a clean and clear read to more accurately diagnose these patients. Finally, all the importance of obtaining a correct diagnosis was sustained so that the treatment is more efficient, effectively the quality of life of patients with Diabetes *Mellitus* MODY type.

Keywords: Genes; Diabetes mellitus; genetic tests; MODY; Sequencing

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC8 - ATP-binding cassette
ADA - Associação Americana de Diabetes
BLK - BLK proto-oncogene
CEL - Carboxyl ester lipase
DM - Diabetes *Mellitus*
DM1 - Diabetes *Mellitus* do tipo 1
DM2 - Diabetes *Mellitus* do tipo 2
DMG - Diabetes *Mellitus* gestacional
DMN - Diabetes *Mellitus* Neonatal
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
GCK - Glucokinase
HNF1A - HNF1 homeobox A
HNF1B - HNF1 homeobox B
HNF4A - Hepatocyte nuclear factor 4
IDF - Federação Internacional de Diabetes
INS - Insulin
IOC - Instituto Oswaldo Cruz
KCNJ11 - Potassium inwardly-rectifying channel
KLF11 - Kruppel-like factor 11
MODY - Maturity-Onset Diabetes of the Young
NEUROD1 - Neuronal differentiation 1
OCT1 - Transportador de cátions orgânicos
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAX4 - Paired box 4
PDX1 - Pancreatic and duodenal homeobox 1
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quadros mostrando partes do mundo e suas respectivas incidências de diabetes em diferentes regiões, em 2021, de pessoas dos 20 aos 79 anos de idade. Junto dos quadros é possível ver a previsão de aumento no número de casos ao longo dos próximos anos.....	17
Figura 2. Diagrama com a divisão das principais formas monogênicas e poligênicas da Diabetes <i>Mellitus</i>	19
Figura 3. Tabela dos 3 principais genes associados a MODY e suas respectivas principais características.....	20
Figura 4. Esquema com os genes mais conhecidos e associados a MODY.....	21
Figura 5. Imagem do papel fisiológico e funcional do <i>HNF1A</i> nos órgãos fígado, rins, pâncreas e intestino.....	22
Figura 6. Representação molecular 3D do <i>HNF1A</i>	23
Figura 7. Diagrama sobre caminhos de perguntas feitas para encontrar o diagnóstico correto sobre o subtipo de Diabetes <i>Mellitus</i>	26
Figura 8. Tabela que mostra os éxons e sua temperatura escolhida através do teste de gradiente para realizar o PCR.....	29
Figura 9. Tabela com a quantidade de cada reagente para realizar o PCR dos 10 éxons do <i>HNF1A</i>	30
Figura 10. Oligonucleotídeos utilizados na PCR para os éxons do gene <i>HNF1A</i> . Apresenta a temperatura de <i>melting</i>	31
Figura 11. Foto de gel realizado como teste de gradiente para o éxon 2	31
Figura 12: O eletroferograma dos trechos da fita F e da fita R do éxon 1.....	34
Figura 13: Eletroferograma dos trechos da fita F e da fita R do éxon 2	35
Figura 14: Eletroferograma dos trechos da fita F e da fita R do éxon 3	36
Figura 15: Eletroferograma dos trechos da fita F e da fita R do éxon 4	37
Figura 16: Eletroferograma da fita F e a fita R do éxon 5	38
Figura 17: Eletroferograma dos trechos da fita F e da fita R do éxon 6.....	39
Figura 18: Eletroferograma do éxon 7, da fita F e da fita R	40
Figura 19: Eletroferograma dos trechos da fita F e da fita R do éxon 8 e 9.....	41
Figura 20: Eletroferograma dos trechos da fita F e da fita R do éxon 10.....	42

ÍNDICE

1. Introdução.....	15
1.1 Doenças genéticas.....	15
1.2. Diabetes <i>Mellitus</i>	15
1.2.1. Prevalência.....	16
1.2.2. Subtipos de Diabetes <i>Mellitus</i>	17
1.3 <i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> (MODY).....	20
1.3.1. Subtipos de MODY.....	21
1.3.2. <i>HNF1A</i>	22
1.4 Diagnóstico e tratamento.....	23
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivos específicos.....	27
3. Metodologia.....	28
3.1. Seleção de amostra.....	28
3.2. Coleta de material biológico.....	28
3.3. Extração do DNA.....	28
3.4. Verificação da integridade e quantificação do DNA.....	28
3.5 Teste de gradiente.....	29
3.6. Amplificação dos éxons.....	29
3.7. Sequências de referência e escolha dos oligonucleotídeos.....	30
3.8 Eletroforese em gel.....	31
3.9. Sequenciamento de Sanger.....	32
3.10. Análise de sequências.....	32
3.11. Ferramentas de bioinformática.....	32
4. Resultados.....	33
5. Discussão.....	43
6. Conclusão.....	46
7. Referências Bibliográficas.....	46

1. Introdução

1.1 Doenças genéticas

A suscetibilidade de doenças humanas é influenciada por fatores genéticos e ambientais [1]. Segundo dados da Sociedade Brasileira de Genética Médica, aproximadamente 80% das doenças raras são de origem genética. Estas são aquelas que a Organização Mundial da Saúde considera com uma prevalência inferior a 65:100.000 (1,3:200) habitantes [2].

Uma doença genética é capaz de causar inúmeras patologias complexas e intratáveis. Atualmente, devido a técnica de sequenciamento do DNA é possível diagnosticar algumas dessas doença [2]. Devido à queda dos custos do sequenciamento de DNA nas últimas 2 décadas, o diagnóstico destas está ocorrendo com maior agilidade. Dessa forma, é possível diagnosticar mais rapidamente e auxiliar esses pacientes ao melhor tratamento, quando disponível [3].

1.2 Diabetes *Mellitus*

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica, que ocorre quando o pâncreas não é mais capaz de produzir insulina ou quando o corpo não consegue responder de forma adequada a insulina que produz [6]. Uma das grandes características que indivíduos acometidos pela diabetes apresentam é a hiperglicemia, a qual se trata do acúmulo de glicose no sangue [5].

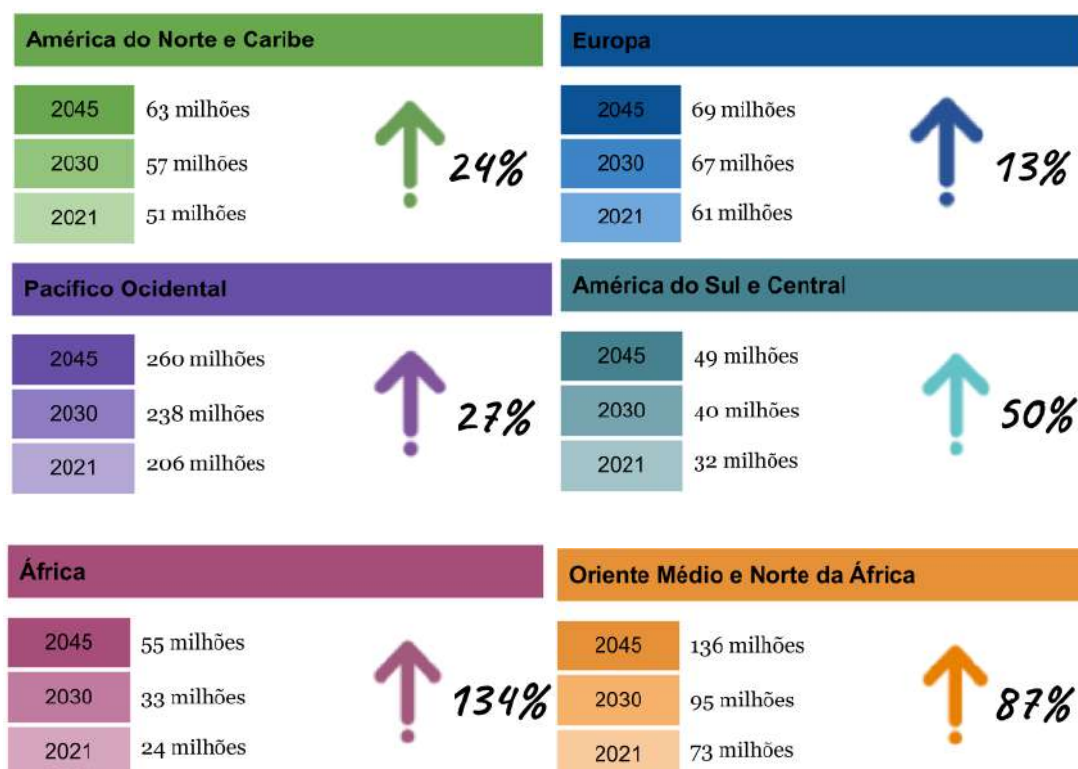
A insulina é um fator fundamental para que haja a comunicação celular de homeostase do sangue, já que ela é o hormônio que é produzido pelo pâncreas e age como uma “chave” para permitir que a glicose dos alimentos que ingerimos passe da corrente sanguínea para as células do corpo, gerando energia [6]. A hiperglicemia presente nos pacientes com diabetes pode desencadear diversos sintomas, como sede, aumento da frequência urinária, fome excessiva, perda de peso e retinopatia diabética. Esses sintomas normalmente se manifestam gradualmente e pioram a qualidade de vida dos portadores, podendo levar à morte [6]. Atualmente sabemos da importância do diagnóstico da diabetes devido ao constante aumento do número de diagnósticos informados nas declarações de óbito (DO) devido a complicações macrovasculares, como as doenças cardiovasculares [32].

1.2.1 Prevalência

No ano 2000, foi publicado o primeiro Diabetes Atlas da Federação Internacional de Diabetes, o qual se trata de um recurso oficial que monitora o impacto global do diabetes produzido pela Federação Internacional de Diabetes (IDF) em colaboração com um comitê de especialistas científicos de todo o mundo [7]. Em sua décima edição, foi relatado ao final do ano 2021 um aumento global contínuo na prevalência do diabetes, confirmando, desta forma, que o diabetes é um desafio global significativo para a saúde pública e para o bem-estar dos indivíduos que são acometidos [7].

Ao final do ano de 2021, 537 milhões de adultos entre as idades de 20 anos até 79 anos viviam com diabetes, representando uma frequência de 1 a cada 10 indivíduos no mundo [6]. Já na América do Sul e Central, 1 a cada 11 indivíduos vivem com diabetes, totalizando 32 milhões de pacientes. Além disso, um em cada dois adultos que vivem com diabetes não são diagnosticados, dificultando seu tratamento e, conseqüentemente, sua qualidade de vida [7].

No gráfico abaixo é possível analisar a prevalência atual de DM entre indivíduos dos 20 aos 79 anos de idade até 2021. Além disso, o gráfico também estima o número de casos até 2045 por região e no mundo [7].



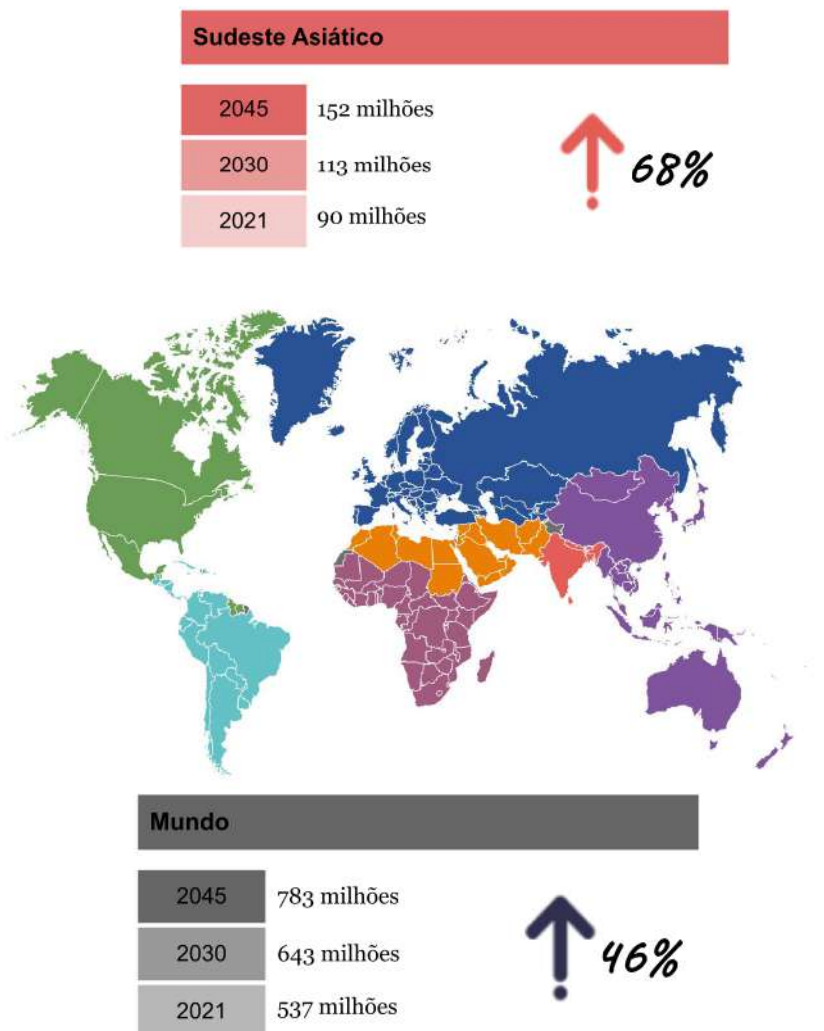


Figura 1: Quadros com a incidência de diabetes, em 2021, de pessoas dos 20 aos 79 anos de idade e uma previsão desses números ao longo dos próximos anos. Fonte; Imagem adaptada de [7].

A partir desses dados é possível concluir que a prevalência de DM na população tende a aumentar ao longo dos anos. E com isso, se faz necessário a disseminação da informação a respeito da importância de seu diagnóstico e seu tratamento.

1.2.2 Subtipos de Diabetes *Mellitus*

A DM é uma das doenças mais comuns na sociedade, e pode ter como origem causas genéticas e/ou causas ambientais [8]. Para realização deste trabalho houve um estudo aprofundado sobre as causas genéticas da DM, as quais podem ser responsáveis pelas formas monogênicas e/ou poligênicas da doença. As formas monogênicas de diabetes são aquelas onde um único gene é responsável pela

alteração e por consequência, da sua variação patológica. Enquanto isso, as formas poligênicas estão relacionadas a variantes em mais de um gene que levam a patologia.

Uma das principais formas poligênicas de diabetes é a do tipo 1 (DM1). Esta é conhecida pelo seu diagnóstico em idade jovem devido a deficiência de insulina no organismo. Nela, o sistema imunológico ataca equivocadamente as células beta, fazendo com que pouca ou quase nenhuma insulina seja liberada para o corpo. Com isso, ocorre o acúmulo da glicose no sangue, o que traz para o paciente sintomas da condição de hiperglicemia. Essa condição pode apresentar características como sede anormal, perda de peso repentina, enurese, visão embaçada entre outras, sendo as formas mais comuns de tratamento são o planejamento alimentar, atividades físicas e aplicação de doses de insulina [6].

A diabetes do tipo 2 (DM2) também é uma forma poligênica da doença, mas que se caracteriza por um diagnóstico mais tardio, normalmente em adultos e idosos. Seu diagnóstico ocorre quando o organismo não consegue usar adequadamente a insulina produzida ou quando não produz o suficiente para que haja o controle da taxa de glicemia. Os sintomas deste tipo de diabetes, assim como na DM1, envolvem as consequências da hiperglicemia. Para este tipo, a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento da doença, afetando a progressão e a gravidade da DM2 [8].

Os sintomas de DM1 e DM2, diferem em alguns pontos. A maioria dos indivíduos com DM2 apresentam os sintomas de forma gradual e com progresso lento. Já nos casos de DM1, os sintomas começam de modo abrupto e podem evoluir rapidamente para uma condição denominada cetoacidose diabética, onde não há insulina suficiente no organismo [9].

Além dos tipos poligênicos da doença, que são os mais comuns, a DM pode se desenvolver também devido a causas monogênicas, onde uma mutação em um único gene interfere na produção ou na efetividade da sua função, causando um efeito patogênico. Entre essas formas monogênicas, é possível citar dois tipos principais: a diabetes *mellitus* neonatal (DMN) e a *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY). A DMN é principalmente caracterizada pela hiperglicemia e baixo peso e é diagnosticada até os 8 meses de vida [10]. Já o MODY é um tipo de diabetes causada por uma alteração patogênica em um dos seus genes candidatos, acarretando em um prejuízo na via.

Na figura abaixo é possível diferenciar as formas monogênicas e poligênicas da doença.

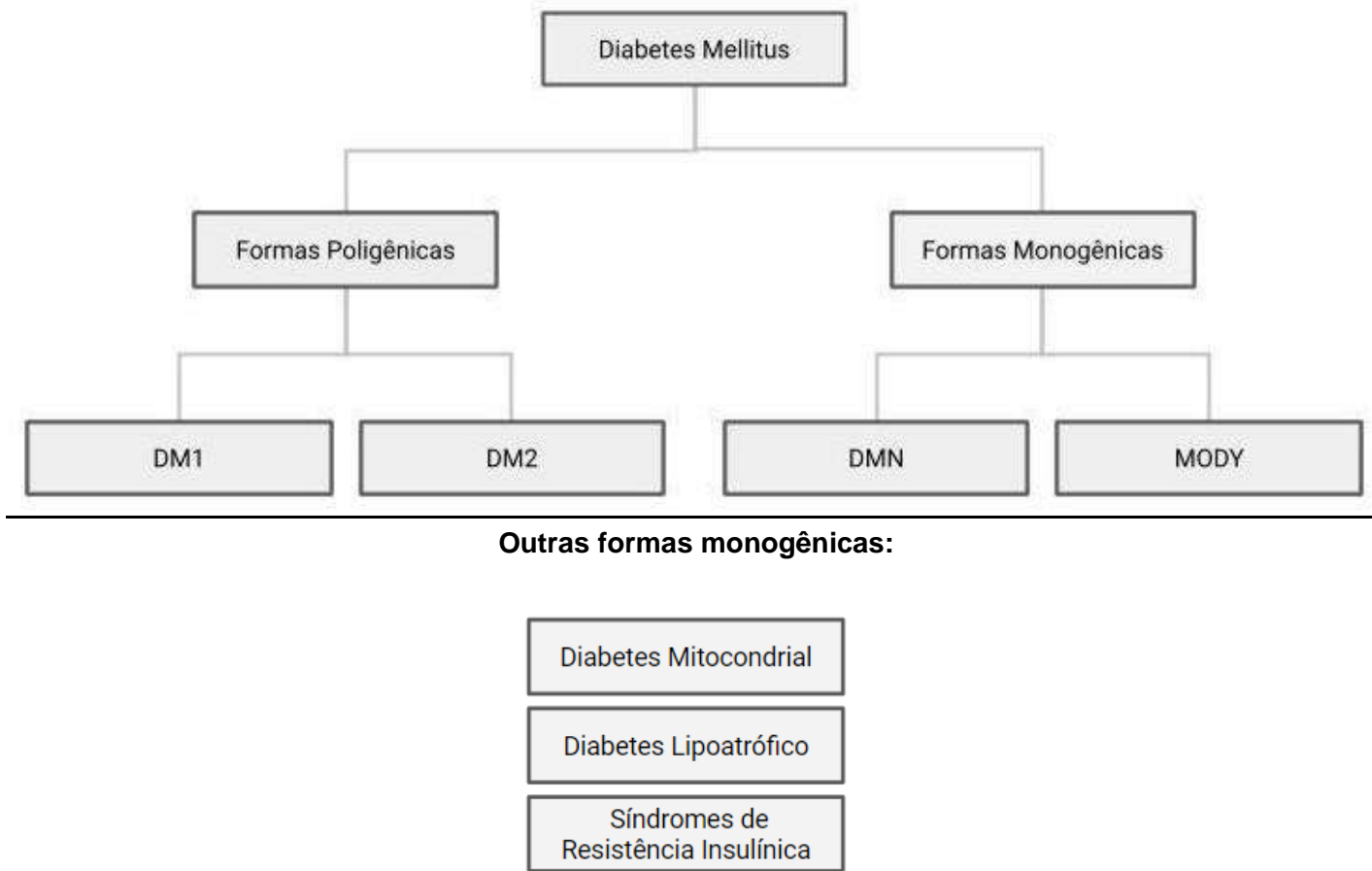


Figura 2: Diagrama que representa a divisão das principais formas monogênicas e poligênicas da Diabetes *Mellitus*. Fonte: figura adaptada [21]

Como causa da diabetes, mais de 14 genes já foram descritos como causadores desta condição [10]. Na tabela abaixo podemos ver os 3 principais genes associados a cada subtipo de MODY com algumas de suas características mais presentes.

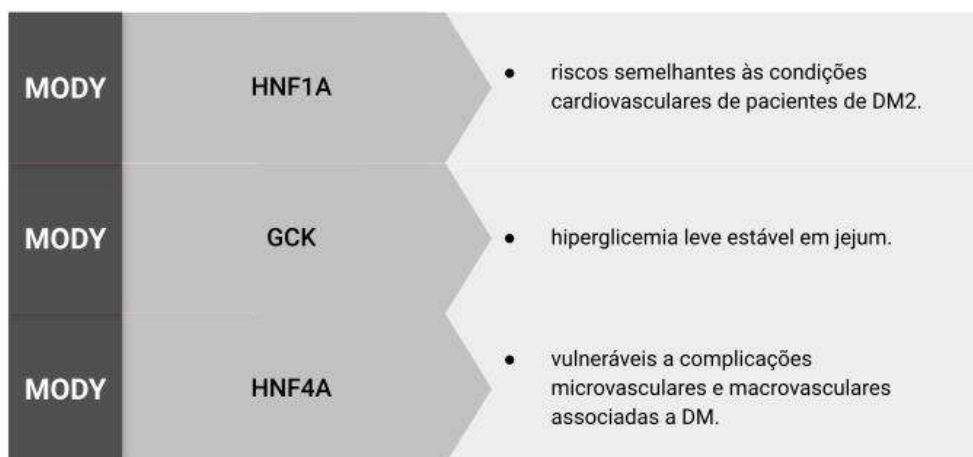


Figura 3: Imagem que mostra os 3 principais genes associados a MODY e suas respectivas principais características. FONTE: elaborado pelo autor.

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

MODY é uma doença monogênica, com padrão de herança autossômica dominante. Sua prevalência é estimada de 1 a 5% de todos os tipos de diabetes na sociedade [12]. Além disso, MODY é uma doença que compreende um grupo heterogêneo de distúrbios monogênicos que vem sendo associados a disfunção das células beta [13].

Uma de suas principais características é a aparição da hiperglicemia em idade precoce, normalmente antes dos 25 anos de idade, por mais que haja um atraso na maioria dos diagnósticos devido à dificuldade de disponibilidade de testes genéticos [11]. O MODY é mais difícil de ser diagnosticado, pois seus sintomas clínicos são facilmente confundidos com DM1 e DM2, se tornando, dessa forma, menos conhecida. Alguns métodos são utilizados para avaliar a possibilidade de MODY em alguns pacientes e diferenciar os subtipos, como por exemplo o teste de autoanticorpos a fim de detectar a autoimunidade da DM1 [11].

Embora a prevalência de MODY possa variar em diferentes grupos étnicos e raciais, a sua prevalência é estimada em 1/10.000 em adultos e 1/23.000 em crianças, tornando-se a forma monogênica de DM mais comum [3-5]. Algumas das suas características clínicas envolvem uma diabetes leve, glicemia de jejum levemente alterada, normalmente detectada em um exame rotineiro, variando de acordo com o subtipo [11].

Informações como o histórico familiar, a ausência de anticorpos pancreáticos, e a baixa necessidade de insulina no tratamento podem ajudar o correto diagnóstico

destes subtipos [11]. Entretanto, seu diagnóstico exige um teste molecular que envolve o rastreamento e a observação de mutações patogênicas nos genes envolvidos [11]. Mesmo que menos conhecida, a prevalência de MODY é estimada em 1,1–6,5% da população de diabetes pediátrica com um alto grau de variabilidade geográfica [15-16].

1.3.1 Subtipos de MODY

Os subtipos mais comuns de MODY são os causados pelos genes: *GCK*, *HNF1A* e *HNF4A*. Além destes, ainda há associação a genes como o: *ABCC8*, *CEL*, *HNF1B*, *INS*, *KCNJ11*, *NEUROD1*, *PDX1*, *BLK*, *KLF11* e *PAX4* [10].

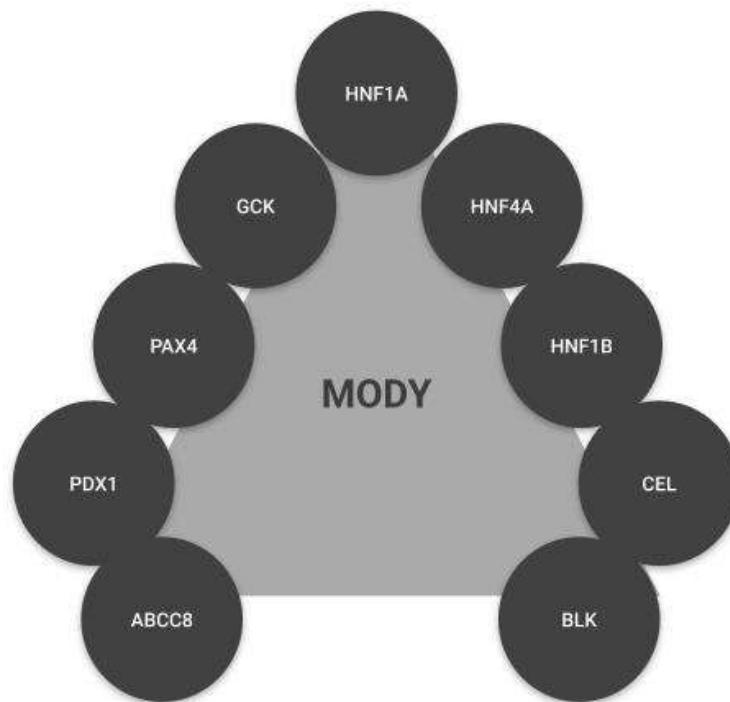


Figura 4: Esquema com os genes mais conhecidos e associados a MODY. Fonte: O autor.

Juntos, *GCK*-MODY, *HNF1A*-MODY e *HNF4A*-MODY representam mais de 90% dos casos de MODY com confirmação genética em vários estudos no Reino Unido, Europa e EUA [15].

Dentre esses, o *HNF1A*-MODY é a forma mais comum de MODY que resulta em diabetes familiar sintomática [17].

1.3.2 *HNF1A*

Como já citado neste estudo, a MODY pode ser causada por uma alteração no gene *HNF1A*, que geralmente se apresenta durante a adolescência ou início da idade adulta com hiperglicemia pós-prandial inicial seguida de hiperglicemia em jejum [16]. Este subtipo é conhecido por ser causado por uma variante patogênica heterozigótica em *HNF1A*, a qual codifica um fator de transcrição importante na diferenciação e função pancreática [16].

O gene *HNF1A* está localizado no cromossomo 12 (NC_000012.12) na região 12q24.2. [10]. Este gene, *HNF1A*, codifica um fator de transcrição, pertence à família HNF1 *homeobox*, e controla a expressão de diversos outros fatores, trazendo possíveis influências e interações [18].

São conhecidas três isoformas transcricionais de *HNF1A* (isoforma A, B e C), onde as três já foram descritas como sendo geradas a partir do mesmo promotor por *splicing* alternativo e poliadenilação diferente [18]. A isoforma mais longa é o *HNF1A A*, com 10 éxons. Já a mais curta é a *HNF1A C* com 6 éxons e a *HNF1A B* com 7 éxons [10].

Vale ressaltar que o *HNF1A* é expresso principalmente no fígado, rim e pâncreas, sendo descrito também no intestino [10,19]. Na figura é possível ver o papel fisiológico do *HNF1A* nesses tecidos.

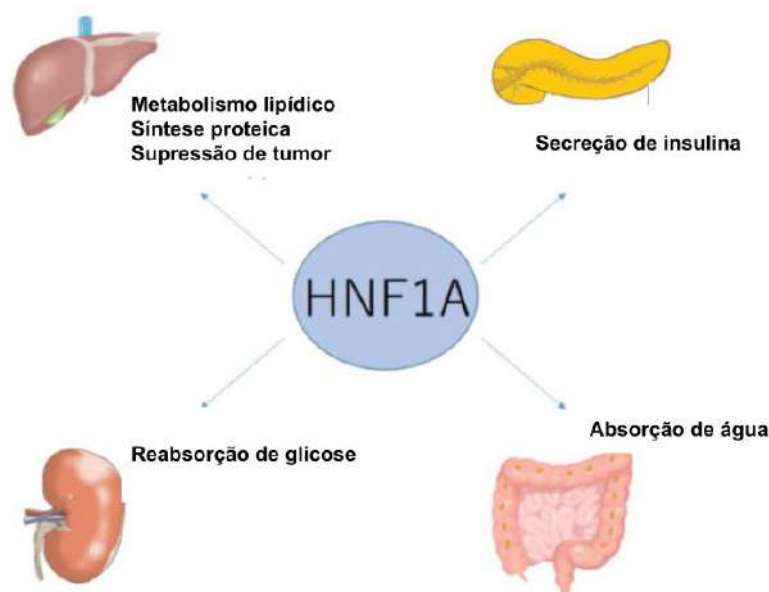


Figura 5: imagem representando o papel fisiológico e funcional do *HNF1A* no fígado, rins, pâncreas e intestino. Fonte: imagem adaptada de [20].

Na fisiopatologia do *HNF1A* temos o desempenho de um papel importante durante o desenvolvimento embrionário, pois afeta o crescimento das células epiteliais intestinais e a diferenciação da linhagem celular. O *HNF1A* pode também ajudar a promover a expressão do transportador de cátions orgânicos 1 (OCT1) no fígado, o qual é responsável pela captação hepática de moléculas orgânicas pequenas, hidrofílicas e carregadas positivamente [10].

Abaixo é possível ver a visualização 3D do fator nuclear de transcrição produto do gene *HNF1A*:

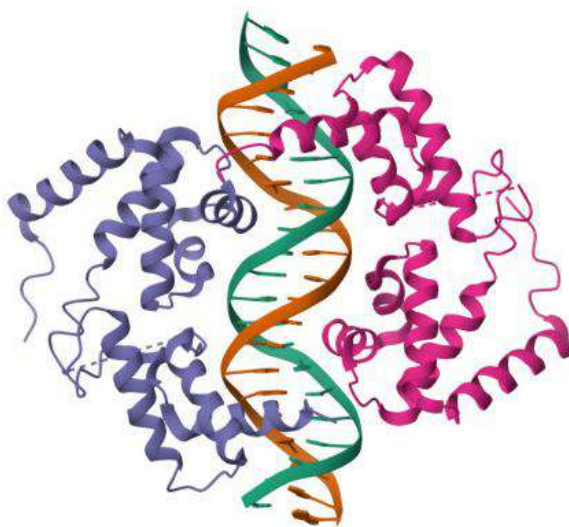


Figura 6: representação molecular 3D do HNF1A. Fonte: representação disponível no banco *Protein Data Bank*.

1.4 Diagnóstico e tratamento

Um a dois por cento dos casos de diabetes têm uma causa monogênica, mas o atraso no diagnóstico ou os diagnósticos incorretos, muitas vezes confundidos com os de causa poligênica acontecem com frequência [13].

É possível dizer que o diagnóstico correto de MODY é um desafio até os dias atuais, e ainda apresenta bastantes dificuldades no caminho até o diagnóstico preciso. O MODY ainda é uma doença pouco conhecida quando comparada a DM1 ou DM2. Além disso, seu quadro clínico se apresenta de forma muito heterogênea, possuindo ainda sintomas em comum com outros tipos de diabetes de maior prevalência [13].

O quadro clínico que os pacientes irão apresentar depende diretamente da sua alteração e seu de subtipo de MODY, assim como seu prognóstico e a resposta ao tratamento específico realizado [13]. O método mais tradicional e conhecido usado

para a identificação de MODY em indivíduos é o sequenciamento direto dos genes mais comumente afetados em MODY, como *HNF1A*, *GCK* e *HNF4A* [22]. Atualmente, este teste genético utilizado para o diagnóstico para MODY ainda é considerado raro quando comparado a sua necessidade [23].

É possível dizer que graças ao advento da tecnologia mais recente, a maioria dos estudos tem usado o sequenciamento completo do exoma, sendo mais vantajoso, pois dessa forma, além de mostrar os genes já associados e se há alteração neles ou não, ainda auxilia na identificação de novos genes envolvidos em MODY. Entretanto, essa técnica ainda é considerada pouco disseminada devido ao alto custo da sua aplicação [22].

A respeito da história parental de diabetes, é possível dizer que é mais comum em MODY do que em DM1, por mais que a história familiar por si só não diferencie bem entre essas doenças [14]. Apesar da ampla disponibilidade de testes genéticos moleculares, e dos estudos mais recentes a respeito do sequenciamento, a identificação de pacientes com MODY continua sendo um desafio para médicos e cientistas [24]. Esse desafio continua em razão do diagnóstico genético preciso de MODY ainda ter importantes implicações clínicas para pacientes e seus familiares de maneira individual [13]. Para tentar se aproximar o máximo possível desta realidade, os médicos devem buscar analisar minuciosamente cada paciente e seus sintomas, e além disso, estar cientes das causas mais raras de diabetes, particularmente em MODY [13].

Um fator importante e que é capaz de aproximar um diagnóstico preciso é o teste genético familiar de pacientes. Os recém-diagnosticados com uma doença genética podem, por consequência, melhorar o diagnóstico precoce de membros da família, permitindo que os pacientes recebam terapias e tratamentos específicos para doenças, quando disponíveis [25].

Uma ferramenta útil para os dias atuais, e pouco conhecida, é a calculadora de probabilidade MODY (MPC), a qual foi testada na pesquisa feita por alguns colegas de laboratório, membros do LGH. Esse tipo de teste superficial foi desenvolvido e validado pelo grupo da Universidade de Exeter em caucasianos de 1 a 35 anos para os três tipos MODY mais comuns (*GCK*-, *HNF1A*- e *HNF4A*- MODY) [26]. Para fazer uso desta ferramenta basta acessar o site original e preencher com seus dados (<https://www.diabetesgenes.org/exeter-diabetes-app/>).

Atualmente, a calculadora usa idade atual, idade no momento do diagnóstico, sexo, etnia, regime de tratamento, IMC, HbA1c, história parental de diabetes e a presença de características clínicas associadas aos fenótipos MODY para calcular uma probabilidade pós-teste de MODY [26]. Os autores sugeriram que as probabilidades pós-teste > 10% e > 25% devem desencadear testes genéticos em pacientes que são e não são tratados com insulina dentro de 6 meses após o diagnóstico, respectivamente [26]. O modelo foi desenvolvido utilizando as características dos três tipos MODY mais comuns, portanto, pode não ser aplicável a outros tipos MODY. O modelo também não inclui autoanticorpos de ilhotas e status de peptídeo C, os quais podem ser muito úteis na seleção de casos para testes genéticos MODY [27].

Esta é uma ferramenta útil para muitos casos, mas como uma forma de apenas direcionar, e não de diagnóstico. É necessário que os profissionais estejam cientes de certas limitações desta calculadora MODY e atentos a outras questões do paciente [27]. Vale ressaltar que a calculadora foi inicialmente desenvolvida em caucasianos e sua aplicabilidade a outras raças/etnias ainda não foi determinada [27]. Com isso, é possível concluir que o diagnóstico de MODY envolve muitos questionamentos e análises diferentes. E é apenas com a junção de todos os fatores analisados que é possível chegar a um diagnóstico.

No esquema abaixo estão descritos todos os questionamentos e análises que devem ser feitas até chegar a uma conclusão no diagnóstico do indivíduo.

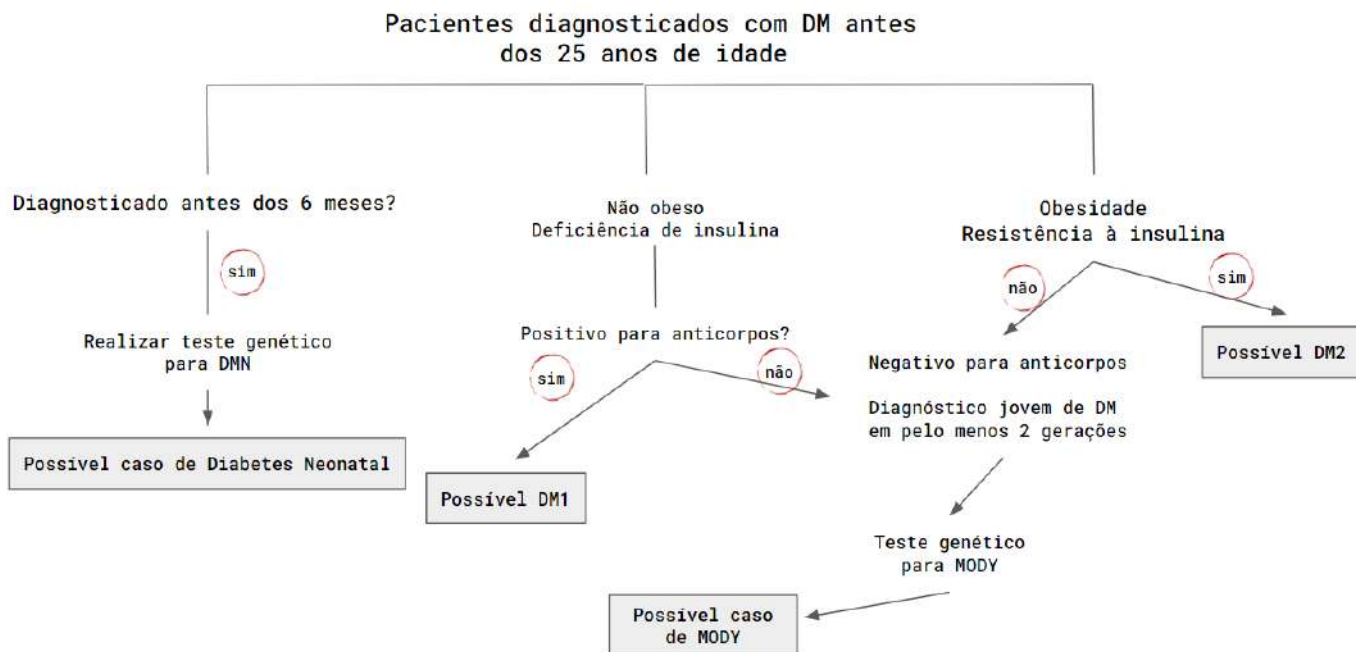


Figura 7: Diagrama representando alguns dos caminhos de perguntas feitas para encontrar o diagnóstico correto sobre o subtipo de Diabetes *Mellitus*. Fonte: imagem adaptada de [20].

Com isso, é possível perceber a importância e a necessidade dos testes moleculares para o diagnóstico de doenças menos comuns e prevalentes na sociedade, como a DM tipo MODY, visando a melhoria da qualidade de vida dos portadores e o maior controle da doença.

2. Objetivo Geral

O estudo visou validar o sequenciamento de Sanger do gene *HNF1A* como principal forma de diagnóstico para DM do tipo MODY.

2.1 Objetivos Específicos

- Ratrear na literatura sobre MODY, seus genes e subtipos;
- Buscar a sequência de referência dos genes em bancos de dados;
- Buscar os métodos estabelecidos e teste/anelamento dos oligonucleotídeos publicados;
- Realizar a amplificação por PCR de cada um dos éxons codificantes do gene *HNF1A*;
- Implementar e testar um método de sequenciamento de DNA para diagnóstico molecular de MODY-HNF1A;
- Analisar a sequência obtida e classificar se está boa para realizar a leitura;
- Validar o sequenciamento de Sanger como melhor forma atual de amplificar as regiões codificantes do gene *HNF1A* e seus limites éxons e íntrons;

3. Metodologia

3.1. Seleção de amostra

As amostras foram selecionadas com base no fenótipo clínico sugestivo de diabetes monogênico do tipo MODY.

Alguns critérios de inclusão utilizados foram:

- 1) A Idade de diagnóstico de DM \leq 40 anos;
- 3) Autoanticorpos contra célula β -pancreática negativos;
- 4) Índice de Massa Corporal (IMC) \leq 30 kg/m²; 5);
- 5) Não apresentar características de DM secundário.

3.2. Coleta de material biológico

As amostras de saliva (ou sangue) foi coletada dos pacientes.

3.3 Extração do DNA

As amostras foram extraídas a partir dos leucócitos do sangue periférico através da utilização de kit (Wizard® Genomic DNA Purification, Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

A extração do DNA também ocorreu através da saliva, pelo método Aidar e Line et al.(2007). Neste protocolo, é solicitado que o paciente enxágue vigorosamente a boca com 5ml de água ultrapura por 60 segundos. Em seguida, a saliva de cada paciente é armazenada adequadamente e em seguida centrifugado para extração o DNA.

3.4 Verificação da integridade e da quantificação do DNA

A integridade das amostras de DNA foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e a concentração e pureza aferidas através de espectrofotometria (Nanodrop). As amostras seguem protocolos de conservação, como serem armazenadas em freezer a -20°C até o momento da análise.

3.5. Teste de gradiente

A padronização da reação da cadeia de polimerase (PCR) foi iniciada com os testes de gradiente para os primeiros dez éxons do gene *HNF1A* para confirmar a melhor temperatura de anelamento. Para realizá-los, cada éxon foi submetido a diferentes temperaturas em uma ciclagem no termociclador (Veriti). Desta forma, cada éxon amplificou melhor em uma determinada temperatura. Abaixo é possível ver o resultado, onde colocamos cada éxon ao lado da sua melhor temperatura para realizar o PCR.

<i>Éxons</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
<i>ÉXON 1</i>	60°C
<i>ÉXON 2</i>	60°C
<i>ÉXON 3</i>	58°C
<i>ÉXON 4</i>	62°C
<i>ÉXON 5</i>	62°C
<i>ÉXON 6</i>	62°C
<i>ÉXON 7</i>	58°C
<i>ÉXON 8</i>	60°C
<i>ÉXON 9</i>	60°C
<i>ÉXON 10</i>	60°C

Figura 8: Tabela que mostra os éxons e sua temperatura escolhida através do teste de gradiente para realizar o PCR.

3.6 Amplificação dos éxons

Após a padronização, realizamos a amplificação das regiões de interesse. As reações foram realizadas com volume total de 25 µL, conforme mostrado no protocolo da Figura 9.

REAGENTES	ÉXONS									
	1	2	3	4	5	6	7	8/9	10	
Água					15,8 µL					
Tampão de reação 10x					2,5 µL					
MgCl 50mM					1,0 µL					
dNTP 5mM					2,5 µL					
Oligonucleotídeo F (10mM)					1,0 µL					
Oligonucleotídeo R (10mM)					1,0 µL					
Platinum (DNA polimerase)					0,2 µL					
DNA					1,0 µL					
Volume Total					25,0 µL					

Figura 9: tabela que mostra a quantidade de cada reagente para realizar o PCR dos 10 éxons do HNF1A. Fonte: o autor.

A reação ocorre no Termociclador Veriti 96 nas seguintes condições de ciclagem: 95 °C por dez minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por um minuto, 60 °C por um minuto e 72 °C por um minuto. Por fim, uma extensão de 72 °C por dez minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose, explicado abaixo.

3.7 Sequências de referência e escolha dos oligonucleotídeos

O transcrito do gene utilizado como base para este estudo foi o ENST00000257555.11, que possui aproximadamente 3442 pares de base. Este transcrito possui 10 éxons, e seu tamanho aproximado é de 23kb, disponível no banco de dados do Ensembl. O ideal é fazer a cobertura de toda a região codificante por sequenciamento automático (sequenciamento de Sanger) no intuito de identificar variantes no gene. Assim, desenhamos 9 pares de primers no Primer3Plus, abrangendo todos os éxons do gene *HNF1A* de forma independente (com exceção do 8 e 9) (Figura 10).

ÉXONS	Forward (F)	Reverse (R)	TM (°C)
1	GTGGGTGCAGGAGTTTGGT	aggagagcctagaggggcc	60
2	gggttgacaaggtccagca	gtcagtgggattcaacctgca	60
3	aggtcaggggaatggacg	ggcctgtaaaggctgtcca	58
4	acagggttcctctgagcctg	tgtcccagtgacagcagtca	62
5	aagtgctgagggctgtgga	gcagggagattctggagcagtcc	62
6	agggagattctggagcagtcc	ggaagagccactgggactca	62
7	gctgttctgaccaccct	gtgattgaggggtctgcag	60
8/9	ctgggactagggctgtcagg	tccacccccctccttactgt	60
10	ctgctgtgatccagga	AGAAAGGGAGGGCTCTGAGG	60

Figura 10: Oligonucleotídeos utilizados na PCR para os exons do gene *HNF1A*; Fonte: elaborado pelo autor.

3.8. Eletroforese em gel

Essa técnica é utilizada para separar os fragmentos de DNA com base no tamanho e carga por passagem de uma corrente (90v) através de um gel de agarose (1,5g de agarose diluído em 100ml de TAE 1X).

Nos poços do gel são aplicados 4µL da amostra de interesse, somado a 2µL de tampão e 2µL de corante gel red. Vale ressaltar que no primeiro poço de cada fileira é aplicado 4µL de um marcador de peso molecular (*Ladder*) somado a 2µL de tampão e 2µL de de corante gelred para que seja possível visualizar o tamanho dos fragmentos em pares de bases aplicados nos poços seguintes.

Após a corrida, o gel é submetido a um transiluminador sob luz UV.

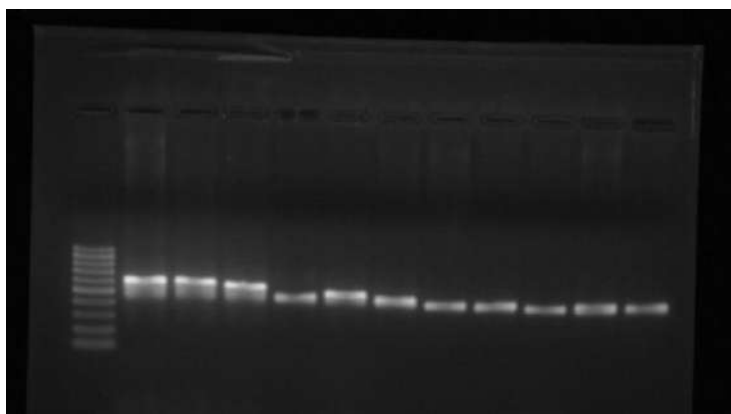


Figura 11: foto de gel realizado como teste de gradiente para o éxon 2, indicando ter aproximadamente 400 pares de base. Fonte: o autor.

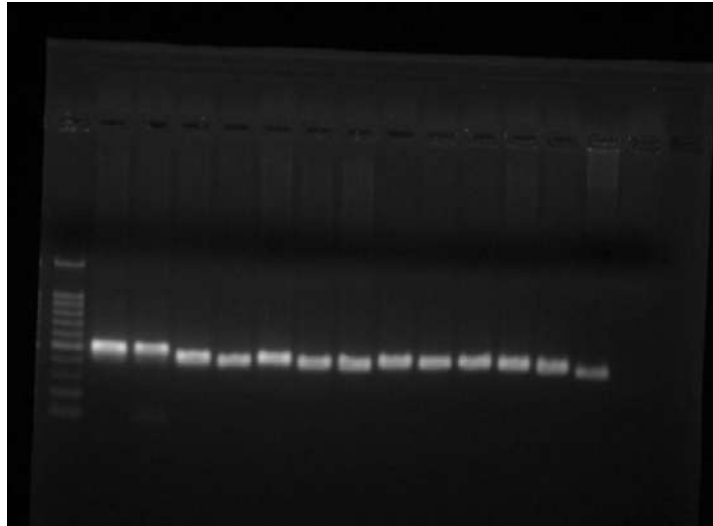


Figura 11: foto do resultado do PCR realizado com o éxon 3. Fonte: o autor.

3.9. Sequenciamento de Sanger

Depois da visualização dos produtos amplificados em gel de agarose (1,5%), as amostras amplificadas foram purificadas através do kit ExoSAP-IT (THERMO FISHER SCIENTIFIC, EUA) seguindo as proporções recomendadas pelo fabricante. O rastreamento de toda a região codificante do gene de interesse foi realizado pelo sequenciamento automático de Sanger.

O volume final padrão das reações de 10 μ L: 10-40 ng do produto do PCR, tampão de sequenciamento (1x), 0,5 μ L de Big Dye e 0,32 pmol de oligonucleotídeos e completando o volume com MilliQ. A reação ocorre nas seguintes condições de ciclagem: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, e 60°C por 40 segundos.

3.10. Análise de sequências

A partir dos sequenciamentos automáticos, foram gerados eletroferogramas para serem analisados através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2). O software também fornece o alinhamento das sequências nucleotídicas dos pacientes para os éxons trabalhados com a sequência selvagem utilizada como referência (transcrito HNF1A-201, número de identificação no Ensembl: ENST00000257555.11).

3.11. Ferramentas de bioinformática

Algumas ferramentas *in silico* são utilizadas para analisar as alterações observadas. Neste estudo, foram utilizadas algumas plataformas para chegar a um resultado completo, podendo comparar às variantes ou mutações previamente descritas presentes em bancos de dados. Uma das ferramentas mais importante, foi o programa BioEdit, com objetivo de editar e visualizar o alinhamento das sequências biológicas estudadas.

A plataforma *Ensembl, genome browser*, fornece suporte no âmbito de pesquisas genômicas. Através desta ferramenta é possível coletar diversos dados úteis sobre a doença e a respeito do *HNF1A*, como: calcular alinhamentos, encontrar genes e validar funções regulatórias. Através dela é possível buscar os alinhamentos selvagens do gene e compará-los com os dos pacientes pelo BioEdit. Após a comparação, também é possível validar as alterações encontradas, buscando se já foram descritas anteriormente.

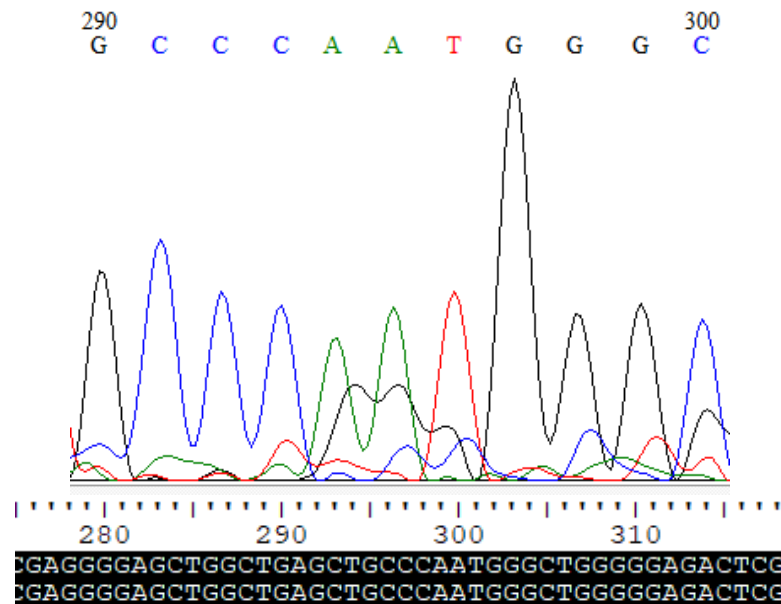
É comumente utilizado também o Varsome, um mecanismo de pesquisa de variantes do genoma humano. Nele, é possível identificar as alterações encontradas, apresentando os estudos que as envolviam, junto de seu *status* de patogênico ou não.

4. Resultados

Após o estabelecimento da reação de sequenciamento foi possível a análise das sequências geradas para 90% da região codificante do gene *HNF1A*, sendo composta pelos éxons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10. O éxon 7 não pode ser amplificado devido a dificuldade de amplificação dessa região de interesse. No entanto, a maior parte dos éxons foi sequenciado com sucesso. Neste sentido, realizamos o sequenciamento das duas fitas (senso e antisenso) de cada éxon buscando confirmar seus resultados. No intuito de exemplificar nossos resultados, apresentamos um trecho de cada éxon amplificado.

ÉXON 1

O eletroferograma da figura 13 representa trechos da fita F e da fita R do éxon 1. Nela, é possível ver o alinhamento da sequência comprada com a sequência selvagem referência, a qual foi retirada do site Ensembl. Para este éxon, obtivemos curvas claras para realizar uma leitura confiável, tendo um melhor resultado na fita R. Fita F



Fita R

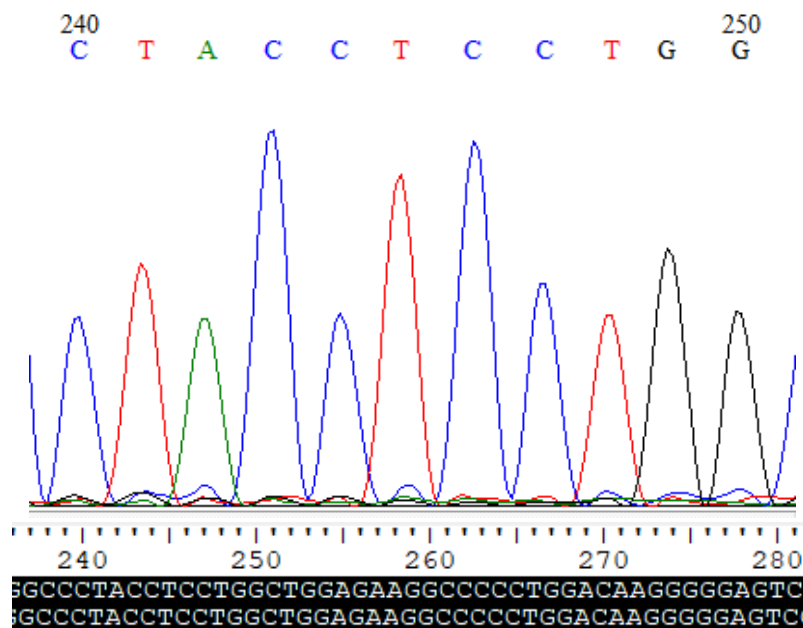
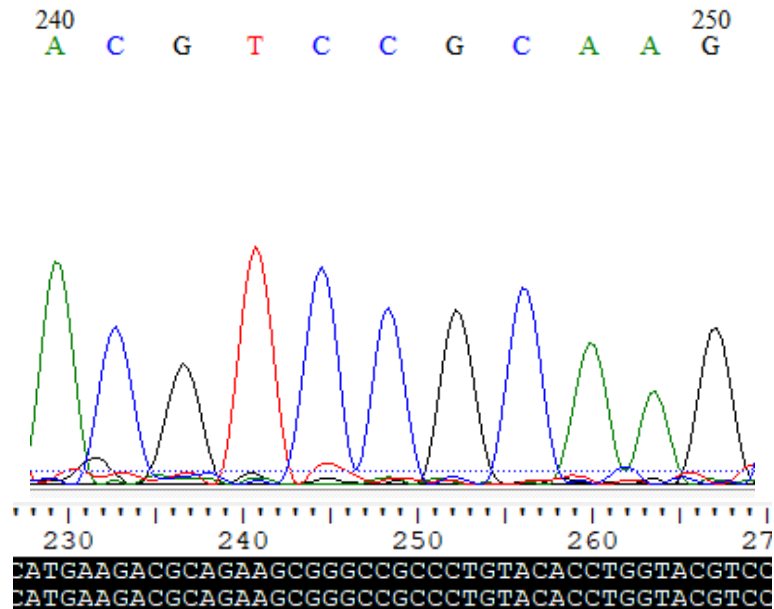


Figura 12: Eletroferograma do éxon 1, trechos da fita F e da fita R.

ÉXON 2

Nesta imagem abaixo é possível ver os trechos da fita F e da fita R do éxon 2. Para este éxon, obtivemos curvas claras para realizar uma leitura confiável nas duas fitas.

Fita F



Fita R

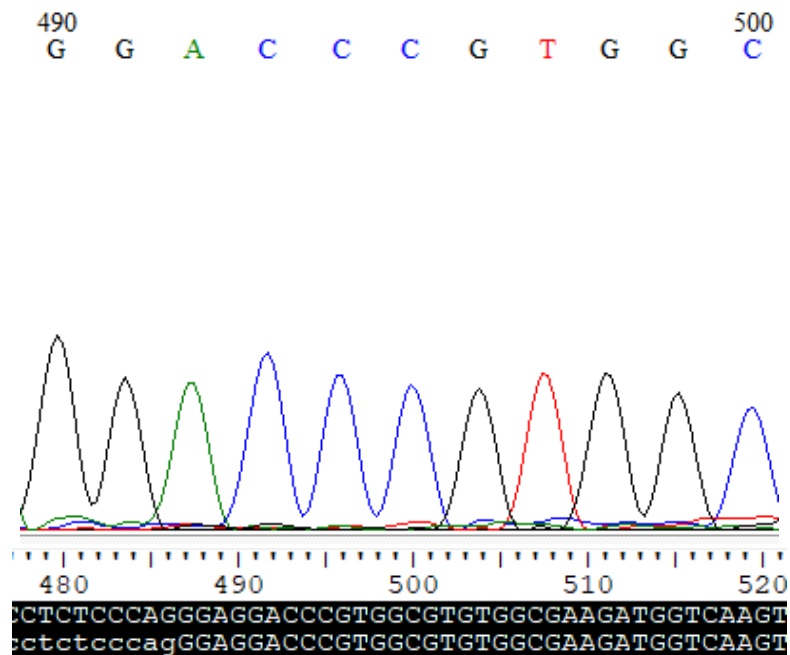
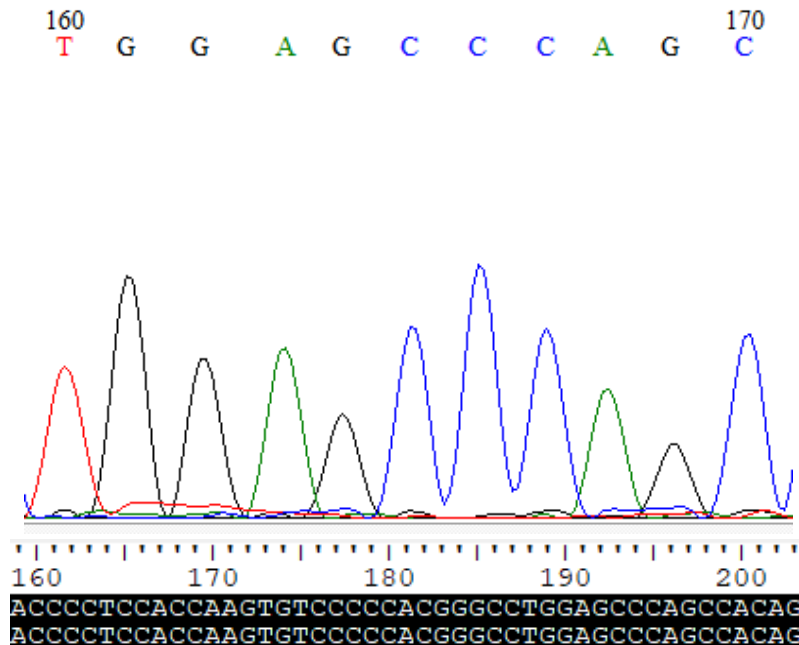


Figura 13: Este eletroferograma mostra trechos da fita F e da fita R do éxon 2.

ÉXON 5

O eletroferograma da figura 17 representa trechos da fita F e da fita R do éxon 5. Para este éxon, obtivemos curvas claras para realizar uma leitura confiável nas duas fitas.

Fita F



Fita R

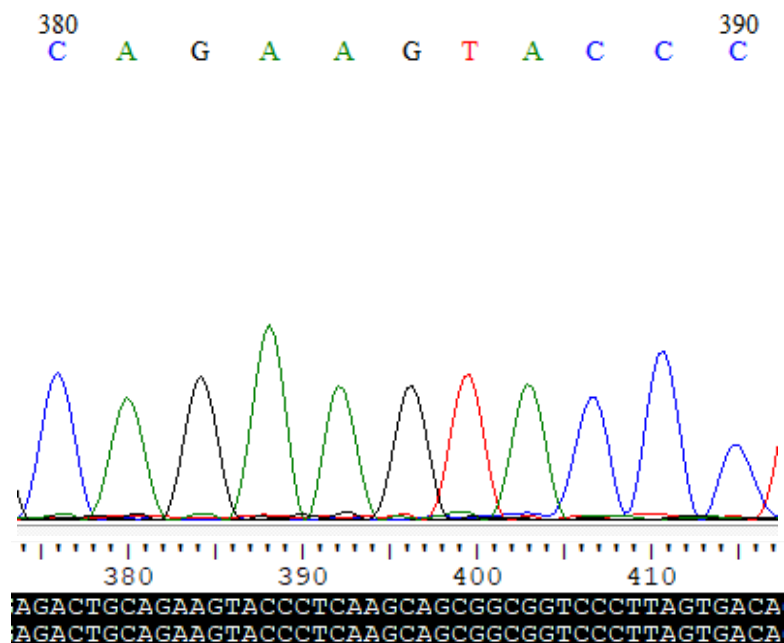
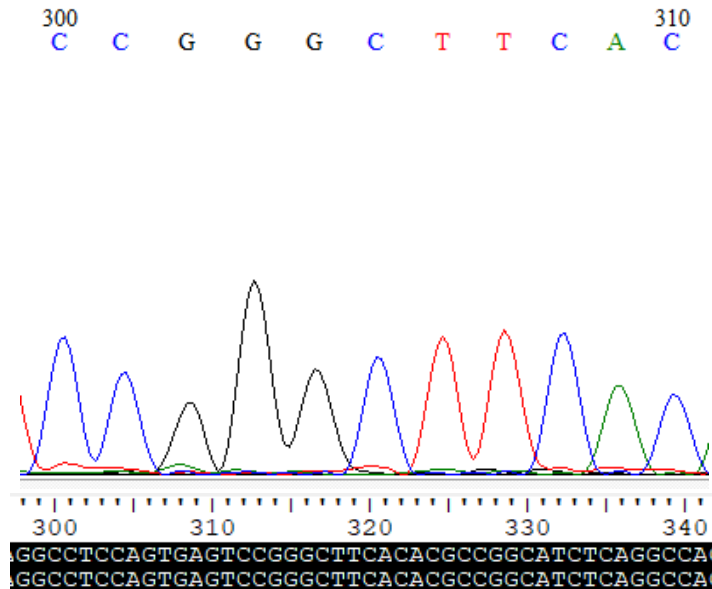


Figura 16: Esses trechos do eletroferograma representam a fita F e a fita R do éxon 5, os quais demonstram excelentes picos para leitura.

ÉXON 8/9

O eletroferograma da figura 20 representa trechos da fita F e da fita R do éxon 8 e 9. Devido à proximidade dessas regiões, foi possível desenhar um único par de oligonucleotídeos para analisar ambos os éxons. Para estes éxons, obtivemos curvas claras para realizar uma leitura confiável nas duas fitas.

Fita F



Fita R

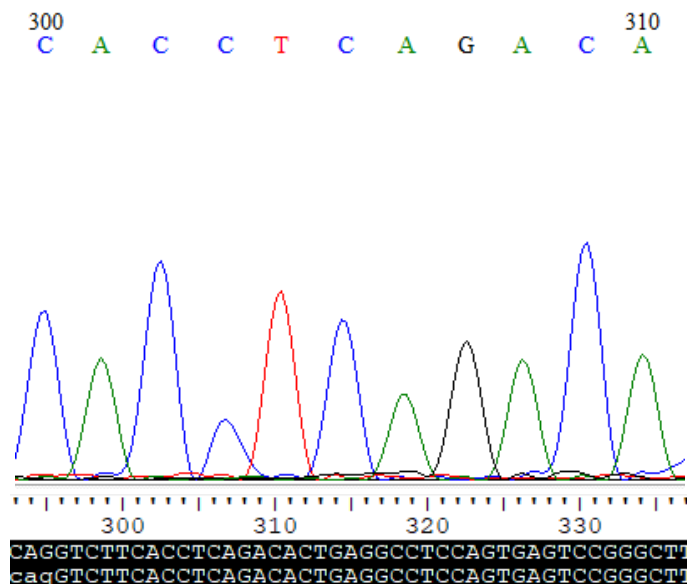


Figura 19: O eletroferograma acima representa trechos da fita F e da fita R do éxon 8 e 9.

5. Discussão

MODY vem sendo frequentemente associado a diferentes genes conforme pesquisas ao longo do mundo acontecem [11]. A Diabetes tipo MODY é definida como um diabetes familiar com idade de diagnóstico precoce, apresentando sintomas leves e facilmente confundidos com outros tipos de diabetes. Seu modo de transmissão é autossômico dominante e vem sendo fortemente associado a defeitos, em geral, no âmbito da secreção de insulina [33].

Por se tratar de uma doença rara, a Diabetes tipo MODY ainda é pouco conhecida, dificultando seu diagnóstico e evolução do quadro a partir de tratamentos [35]. Neste contexto, a prevalência de MODY é de aproximadamente 2-5% dos indivíduos considerados como portadores de DM2 que são, na verdade, diagnosticados erroneamente [35].

Diversos genes já foram identificados como causadores de MODY, sendo os mais estudados o HNF1A, HNF4A e HNF1B [34]. Vale ressaltar que estes são fatores de transcrição, e que têm expressão nas células beta-pancreáticas, considerados reguladores da expressão de alguns genes chave na produção da insulina e também na embriogênese pancreática [34].

O diagnóstico certo a respeito de qual tipo de DM um paciente é portador depende de uma série de fatores, como o acesso a testes genéticos, avaliação do histórico familiar e testes de autoanticorpos. Os pacientes portadores de MODY podem ou não apresentar os sintomas mais comuns de um estado de hiperglicemia, como poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso [36].

Devido a esta variabilidade de sintomas, a diabetes tipo MODY acaba sendo comumente confundida com a DM2. O forte componente hereditário nos dois casos, com história de diabetes afetando múltiplas gerações sucessivas, é uma das principais características similares, podendo dificultar o diagnóstico diferencial [37]. Além disso, ainda há como confundir com a DM1, mesmo que o carácter hereditário da diabetes seja mais comum no MODY do que na diabetes tipo 1. Contudo, uma boa maneira de diferenciar é analisando os anticorpos contra antígenos pancreáticos, já que os portadores de MODY não apresentam níveis elevados, e, além disso, costumam apresentar evidências de produção endógena de insulina [36, 37].

Devido a estes fatores, podemos concluir que apesar de a diabetes tipo MODY ser conhecida como uma doença monogênica, estamos lidando com uma alta variabilidade de casos, representando uma vasta heterogeneidade genética,

metabólica e clínica [38]. Em MODY, podemos dizer que existe uma grande variabilidade fenotípica e metabólica, a qual se reflete em termos de diagnóstico, risco de complicações e tipos de tratamento. Neste momento é preciso ressaltar a importância dos testes genéticos para diagnóstico, pois a partir deles é possível analisar o gene afetado e suas particularidades [39]. Um exemplo desta importância foi a constatação que a localização da mutação dentro do gene *HNF1A* [39].

Estudos prévios do nosso grupo envolvendo o DM tipo MODY e genes candidatos foram investigados previamente. Em um deles, foi investigado a frequência da diabetes monogênica devido a um quadro sugestivo de pacientes com mutação no gene *GCK* e *HNF1A* sendo na maioria das vezes brasileiros. Nessa pesquisa, também foi validado a calculadora de probabilidade MODY (MPC) como um método eficiente para ajudar na seleção dos pacientes [40].

Vale ressaltar que esse estudo foi feito com um grupo de 34 indivíduos sendo 61,7% do sexo feminino, 55,8% faziam uso de insulina e 41,2% faziam uso de antidiabéticos orais. Deste grupo de indivíduos, foram encontradas mutações MODY, *GCK* ou *HNF1A*, em 11 pacientes, o que equivale a 32,3%. Com isso, foi concluído que a calculadora de probabilidade de MODY pode servir como uma boa ferramenta custo-efetiva para selecionar os pacientes, restringindo melhor o grupo de suspeitas e desta forma, reduzindo em até 60% o número de exames e aumentando os casos positivos em 45%. Vale ressaltar que esta calculadora não foi validada para não caucasianos, além disso, não é capaz de diagnosticar sozinha [40].

O diagnóstico e terapêutica errados podem ter um impacto significativo na qualidade de vida e comprometer a otimização do controle glicêmico e, conseqüentemente, aumentar o risco de complicações tardias da diabetes. A partir disso, ressaltamos a importância da disseminação da informação de qualidade, para que as pessoas possam ter um maior conhecimento e busquem a melhor maneira de ter acesso aos testes e tratamentos certos [41].

Como resultado deste estudo, vimos que, por exemplo, o éxon 7 não apresentou um sequenciamento com picos claros e delimitados para uma leitura confiável e, por conseqüência, não foi possível realizar a leitura da seqüência de nucleotídeos deste éxon. E para casos deste tipo, seria necessário repetir os testes em diferentes condições, reavaliando o protocolo e voltando o procedimento do início, passando novamente por cada etapa desde a coleta do material biológico dos pacientes.

Entretanto, foi possível sequenciar todo o restante da sequência codificante do gene *HNF1A*, permitindo o diagnóstico molecular de casos de diabetes do tipo HNF1A-MODY e o tratamento personalizado destes pacientes. Para isso, é necessário que cada mutação seja analisada à parte, identificando o gene alterado, junto da sua posição e tipo de mutação.

O sequenciamento realizado é uma técnica considerada promissora para este tipo de diagnóstico. As curvas bem espaçadas e “limpas” demonstram grande potencial para a descoberta de alterações e possíveis mutações monogênicas ou até mesmo variantes poligênicas. Ao realizar o sequenciamento, deve-se procurar por alterações na sequência das regiões codificantes do gene *HNF1A*, para assim, poder relacioná-las ao possível desenvolvimento de HNF1A-MODY.

Em concordância com este estudo, um trabalho a respeito da caracterização dos pacientes MODY no ambulatório foi realizado no Universidade Estadual Paulista. Neste estudo, foi objetivo identificar os pacientes do ambulatório de DM1 do Hospital das Clínicas de Botucatu (HC-UNESP) suspeitos para o diagnóstico de MODY. Para separar os casos, o autor utilizou a calculadora de risco MODY, validada no Reino Unido e já citada neste trabalho como um bom parâmetro inicial para a divisão dos casos. Sua forma de analisar os pacientes também foi através do sequenciamento do gene *HNF1A*, por ter sido o fenótipo mais similar aos dos pacientes selecionados. Os resultados deste estudo ainda não foram divulgados, mas é válido analisar a importância que o diagnóstico correto está ganhando.

Com o sucesso do sequenciamento na maioria dos éxons e pacientes desta pesquisa, destacamos a importância da sua utilização como método de diagnóstico do diabetes MODY. Ao obter o diagnóstico certo a respeito da DM do tipo MODY, é possível realizar o tratamento de maneira mais específica, dessa forma, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

6. Conclusão

Ao realizar esta pesquisa com o objetivo de implementar e validar o sequenciamento genético como principal forma de diagnosticar casos de DM tipo MODY, foi possível notar, a partir do levantamento bibliográfico realizado, foi possível ver que os testes genéticos são capazes de solucionar os diagnósticos errados e, conseqüentemente a má qualidade de vida de muitos pacientes portadores de MODY.

Também podemos concluir que foi possível ver que o diagnóstico e terapêutica errados podem ter um impacto significativo na qualidade de vida e comprometer a otimização do controle glicêmico e, conseqüentemente, aumentar o risco de complicações tardias da diabetes. O sequenciamento de Sanger realizado é uma técnica considerada promissora para este tipo de diagnóstico, se mostrando ser a melhor forma para diagnosticar esta doença monogênica.

E por fim, nessa pesquisa, em concordância com outro estudo realizado no LGH, também foi validado a calculadora de probabilidade MODY (MPC) como um método eficiente para ajudar na seleção dos pacientes.

7. Referências Bibliográficas

1. Price AL, Spencer CC, Donnelly P. Progress and promise in understanding the genetic basis of common diseases. **Proc Biol Sci.** 2015 Dec 22;282(1821):20151684. doi: 10.1098/rspb.2015.1684. PMID: 26702037; PMCID: PMC4707742.
2. Roth TL, Marson A. Genetic Disease and Therapy. **Annu Rev Pathol.** 2021;16:145-166.
3. Roth TL, Li PJ, Blaeschke F, Roybal K, Shifrut E, Marson A. 2020. Alvejamento de knockin agrupado para engenharia genômica de imunoterapias celulares;
4. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABATES. Diabetes Play, 2023. Disponível em: <<https://diabetesplay.com.br/>>. Acessado em: 20 de maio de 2023.

5. FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABATES. International Diabetes Federation, 2023. Disponível em: <<https://idf.org/about-diabetes/introduction/>>. Acessado em 25 de maio de 2023.
6. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABATES. Sociedade brasileira de diabetes, 2023. Disponível em: <<https://diabetes.org.br/#diabetes>>. Acessado em 25 de maio de 2023.
7. FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABATES. International Diabetes Federation, 2021. Disponível em: <<https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>>. Acessado em 20 de Abril de 2023.
8. Pippitt K, Li M, Gurgle HE. Diabetes *Mellitus*: Screening and Diagnosis. **Am Fam Physician**. 2016 Jan 15;93(2):103-9. Erratum in: Am Fam Physician. 2016 Oct 1;94(7):533. PMID: 26926406.
9. Guzik TJ, Cosentino F. Epigenetics and Immunometabolism in Diabetes and Aging. **Antioxid Redox Signal**. 2018 Jul 20;29(3):257-274. doi: 10.1089/ars.2017.7299. Epub 2017 Oct 16. PMID: 28891325; PMCID: PMC6012980.
10. Valkovicova T, Skopkova M, Stanik J, Gasperikova D. Novel insights into genetics and clinics of the HNF1A-MODY. **Endocr Regul**. 2019 Apr 1;53(2):110-134. doi: 10.2478/enr-2019-0013. PMID: 31517624.
11. Broome DT, Pantalone KM, Kashyap SR, Philipson LH. Approach to the Patient with MODY-Monogenic Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. 2021 Jan 1;106(1):237-250. doi: 10.1210/clinem/dgaa710. PMID: 33034350; PMCID: PMC7765647.
12. Shepherd M, Shields B, Hammersley S, Hudson M, McDonald TJ, Colclough K, et al. Systematic Population Screening, Using Biomarkers and Genetic Testing, Identifies 2.5 % of the U.K. Pediatric Diabetes Population With Monogenic Diabetes. **Diabetes care**. 2016;39(11):1879–88.

13. Shepherd M, Shields B, Ellard S, Rubio-Cabezas O, Hattersley AT. Um diagnóstico genético de diabetes HNF1A altera o tratamento e melhora o controle glicêmico na maioria dos pacientes tratados com insulina. **Diabet Med** 2009;26:437-41
14. Amed S, Oram R. Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): Making the Right Diagnosis to;
15. Tosur M, Philipson LH. Precision diabetes: Lessons learned from maturity-onset diabetes of the young (MODY). **J Diabetes Investig.** 2022 Sep;13(9):1465-1471. doi: 10.1111/jdi.13860. Epub 2022 Jun 16. PMID: 35638342; PMCID: PMC9434589.
16. Stride A, Vaxillaire M, Tuomi T, et al . A anormalidade genética na célula beta determina a resposta a uma carga oral de glicose . **Diabetologia** 2002; 45 : 427–435.
17. Hattersley AT, Greeley SAW, Polak M, et ai . Diretrizes de consenso de prática clínica ISPAD 2018: o diagnóstico e o manejo do diabetes monogênico em crianças e adolescentes . **Pediatr Diabetes** 2018; 19 (Supl. 27): 47–63.
18. Sridhar GR, Nageswara Rao PV, Kaladhar DS, Devi TU, Kumar SV In Silico Docking of HNF-1a Receptor Ligands. **Adv. bioinform.** 2012; 2012 :705435. doi: 10.1155/2012/705435.
19. Urakami T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. **Diabetes Metab Syndr Obes.** 2019 12:1047-1056. doi: 10.2147/DMSO.S179793. PMID: 31360071; PMCID: PMC6625604.
20. Miyachi Y, Miyazawa T, Ogawa Y. HNF1A Mutations and Beta Cell Dysfunction in Diabetes. **Int J Mol Sci.** 2022 Mar 16;23(6):3222. doi: 10.3390/ijms23063222. PMID: 35328643; PMCID: PMC8948720.
21. Siddiqui K, Musambil M, Nazir N. Maturity onset diabetes of the young (MODY)-- history, first case reports and recent advances. **Gene.** 2015 Jan 15;555(1):66-71. doi: 10.1016/j.gene.2014.09.062. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25281821.

22. Szopa M, Ludwig-Galezowska A, Radkowski P, Skupien J, Zapala B, Platek T, et al. Genetic testing for monogenic diabetes using targeted nextgeneration sequencing in patients with maturity-onset diabetes of the young. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**. 2015;125(11):845–51.
23. Thanabalasingham G, Owen KR. Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). **BMJ**. 2011 Oct 19;343:d6044. doi: 10.1136/bmj.d6044. PMID: 22012810.
24. Thanabalasingham G, Shah N, Vaxillaire M, Hansen T, Tuomi T, Gasperikova D, et al. A large multi-centre European study validates high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) as a clinical biomarker for the diagnosis of diabetes subtypes. **Diabetologia** 2011; published online 4 August.
25. Germain DP, Moiseev S, Suárez-Obando F, Al Ismaili F, Al Khawaja H, Altarescu G, Barreto FC, Haddoum F, Hadipour F, Maksimova I, Kramis M, Nampoothiri S, Nguyen KN, Niu DM, Politei J, Ro LS, Vu Chi D, Chen N, Kutsev S. The benefits and challenges of family genetic testing in rare genetic diseases-lessons from Fabry disease. **Mol Genet Genomic Med**. 2021 May;9(5):e1666. doi: 10.1002/mgg3.1666. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33835733; PMCID: PMC8172211.
26. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, et al . O desenvolvimento e validação de um modelo de predição clínica para determinar a probabilidade de MODY em pacientes com diabetes de início jovem . **Diabetologia** 2012; 55 : 1265–1272.
27. Ang SF, Lim SC, Tan C, et al . Um estudo preliminar para avaliar a estratégia de combinar critérios clínicos e sequenciamento de próxima geração (NGS) para a identificação de diabetes monogênico entre asiáticos multiétnicos . **Diabetes Res Clin Pract** 2016; 119 : 13–22. [PubMed]
28. Rozance PJ, Hay WW. Hiperglicemia Neonatal. **NeoReviews**. 2010 11 :e632–9. Internet.

29. Lemelman MB, Letourneau L, Greeley SAW. Neonatal Diabetes *Mellitus*: An Update on Diagnosis and Management. **Clin Perinatol**. 2018 Mar;45(1):41-59.
30. Letourneau L, Carmody D, Wroblewski K, Denson A, Sanyoura M, Naylor RN, Philipson LH, Greeley SAW. *Apresentação e manejo do diabetes na infância: alto risco de cetoacidose diabética (CAD)* Imprensa;
9. Santos VP, Silveira DR, Caffaro RA. Risk factors for primary major amputation in diabetic patients. **São Paulo Med J** 2006;124:660-70.
32. Zhang, Y.; Hu, G. et al. — Glycosylated hemoglobina in relationship to cardiovascular outcomes and death in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, 7(8): e42551, 2012
33. Velho G, Froguel P. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. **Eur J Endocrinol** 1998;138:233-9.
34. Ryffel GU. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. **J Molec Endocrinol** 2001;27:11-29.
35. Ledermann HM. Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? **Lancet** 1995;345:648.
36. Welsh K. Maturity-Onset Diabetes of the Young: A Genetic Form of Diabetes in Children. **Journal of Pediatric Nursing**. 2017; 32: 89-90.
37. Thanabalasingham G, Owen KR. Diagnosis and Management of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY). **British Medical Journal**. 2011; 343: d6044.
38. Kim S. Maturity-Onset Diabetes of the Young: What Do Clinicians Need to Know? **Diabetes and Metabolism Journal**. 2015; 39: 468-477.

39. Gardner D et al. Clinical Features and Treatment of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY). **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**. 2012; 5: 101-108.

40. Tarantino, R. M., Abreu, G. de M., Fonseca, A. C. P. de ., Kupfer, R., Pereira, M. de F. C., Campos Júnior, M., Zajdenverg, L., & Rodacki, M.. (2020). MODY probability calculator for GCK and HNF1A screening in a multiethnic background population. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, 64(1), 17–23. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000173>

41. Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S et al. Prevalence, Characteristics and Clinical Diagnosis of Maturity Onset Diabetes of the Young Due to Mutations in HNF1A, HNF4A, and Glucokinase: Results From the SEARCH for Diabetes Youth. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2013; 98(10): 4055-4062.