

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAIELI BONATTO

PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES GÊNICAS RELACIONADAS AO DIABETES
MELLITUS TIPO MODY NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS, PARANÁ.

CURITIBA

2011

NAIELI BONATTO

PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES GÊNICAS RELACIONADAS AO DIABETES
MELLITUS TIPO MODY NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS, PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari

CURITIBA

2011

A minha avó Adele Trevisan da Silva.

A minha irmã Franciele Bonatto.

Aos meus pais, Antônio e Fátima Bonatto.

Por todo amor, apoio e incentivo.

"A felicidade e a liberdade começam com a clara compreensão de um princípio: algumas coisas estão sob nosso controle, outras não. Só depois de lidar com essa questão fundamental e aprender a distinguir entre o que você pode e o que não pode controlar, é que a tranquilidade interna e a eficácia externa se tornam possíveis."

Epiteto

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A todos os pacientes diabéticos que se disponibilizaram em participar do grupo de estudo.

Aos meus queridos pais, Antonio Bonatto e Fátima da Silva Bonatto, que mais uma vez acreditaram em mim depositando grande apoio e incentivo. Mais uma vez abdicaram da minha presença em prol do meu desenvolvimento profissional e pessoal. À minha avó, Adele Trevisan da Silva, pela confiança, por seu carinho e generosidade com que sempre me incentivou. À Franciele Bonatto, minha querida irmã, que mesmo longe sempre se faz presente em minha vida. Pelo amor incondicional e esforço em compreender as minhas escolhas, por ser sempre ouvidos às minhas angústias e pelo imenso apoio em toda essa caminhada do mestrado.

Aos meus primos, Adriana Aparecida da Silva e César Celestino, que me acolheram em sua casa na minha estada em Curitiba, de coração e braços abertos. Por toda paciência e cuidado oferecidos.

À Carla Dorgam Aguilera, minha querida doutora. Obrigada pelo apoio oferecido, imenso e fundamental, desde a parte técnica desta dissertação até o cuidado em amenizar as dificuldades encontradas. Em meio aos desenganos, seu sorriso sempre bastou para diluir toda inquietação.

Ao meu orientador, Dr Roberto Ferreira Artoni, pela oportunidade em desenvolver o mestrado, pela compreensão com os contratemplos e seu esforço e disponibilidade em auxiliar em todos os aspectos deste trabalho.

A Viviane Nogaroto Vicari, minha co-orientadora, obrigada por compartilhar de sua experiência auxiliando na parte prática e no desenvolvimento de toda dissertação.

Ao amigo e colega de laboratório Paulo Vinicius Svidnicki, pelo apoio fundamental no laboratório, pelas discussões da parte teórica e companhia nos momentos de descontração.

Ao Dr Fabio Quirillo Milleo, por auxiliar na escolha dos pacientes para o estudo e pelas informações pertinentes fornecidas.

A minha querida amiga e colega de mestrado Kaline Ziemniczak, presente nestes dois anos em todos os momentos. Muito obrigada pelo apoio, pelas conversas, pela cumplicidade, pelas divagações no mundo da genética e pela companhia agradável

nos necessários momentos de descontração. Sua amizade e incentivo foram essenciais para atravessar essa fase.

A doutoranda Thais Saad Sczepanski, em quem encontrei uma querida amiga. Obrigada pelo auxílio em resolver vários problemas, obrigada pelas intermináveis caronas tão úteis, pela companhia agradável, pelas conversas e risadas que tanto ajudaram a distrair.

À Tatiane Klingelfus, por toda a amizade e cumplicidade, sempre disposta a ajudar, a ouvir, a entender.

A Rosimar Noceti Silvestri, pelas conversas providenciais que ajudaram a enfrentar todo tipo de problema.

A todos os colegas do mestrado: Cynthia Hernandez, Elisandro Bruscato, Geórgia Gelmini, Heloisa Zaccaron, Juliana Marta Fischer, Laercio Dante Piancini, Luana Carvalho dos Santos, Luciana Viater Tureck, Nayara dos Santos Oliveira, Rodrigo Schuh que fizeram parte do crescimento pessoal e profissional desta fase. E agradeço especialmente aos colegas Bruno Zagonel Piovezan, Kaline Ziemniczak, Larissa Guimarães, Mariane Madalozzo, Ricardo Dalla Costa e Thaís Chaves, que principalmente durante minha estada em Curitiba foram as principais companhias e apoio, capazes de tornar divertidas as mais teóricas das aulas. Obrigada pela amizade, pela força e companhia nos momentos difíceis e nas horas de festejar.

A todo o pessoal do laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG, especialmente aos alunos Alain de Barros, Barbara de Melo, Daniele Tasiar, Jonathan Castro, Kamila Oliveira Rosa, Leonardo Gusso Goll, Marcela Puci Baer, Michele Orane, Paulo Svidnicki, Priscila Estabile, Ricardo Oliveira Brito, Talita Zajac dos Santos, Tatiana Cristina Machado, Thais Saad Sczepanski, ao técnico de laboratório Miguel de Carvalho e aos professores (as) doutores (as) Mara Cristina de Almeida, Marcelo Vicari, Roberto Ferreira Artoni e Viviane Nogaroto Vicari.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR que contribuíram compartilhando de seu conhecimento para minha formação no mestrado, especialmente ao prof. Dr Ricardo Lehtonen de Souza e a Profª Dra Valéria Roxo (da minha banca de acompanhamento), obrigada pelas sugestões e correções ao projeto.

A Capes e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

RESUMO

A ocorrência de diabetes mellitus tipos 1 e 2 é bem documentada na literatura científica. Contudo, existem pelo menos 6 subtipos variantes de diabetes, de caráter monogênico, denominados diabetes tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), responsáveis por aproximadamente 10% de todos os casos de diabetes mellitus. Estes exibem um padrão de herança autossômica dominante, são de manifestação precoce e nem sempre requerem qualquer tipo de medicação ou insulino-terapia para tratamento. O diagnóstico precoce desta doença é de extrema importância, visto que tratamentos eficazes rendem melhores prognósticos ao paciente. Estudos epidemiológicos demonstram que dentre as formas já conhecidas de diabetes tipo MODY, as mais recorrentes são as do tipo 2, causadas por mutações na enzima Glicoquinase (GCK) e 3, provocadas por mutações no fator de transcrição Hepatocítico Nuclear 1 α (HFN1 α). Estudos envolvendo a identificação e prevalência de subtipos de MODY na população brasileira são escassos e pouco informativos, apontando para a necessidade de uma investigação minuciosa sobre a ocorrência deste tipo de diabetes. No presente estudo, amplificações das regiões exônicas e posterior sequenciamento nucleotídico das mesmas foram utilizados para realizar prospecção de mutações no gene *HFN1 α* em pacientes da região dos Campos Gerais-PR, suspeitos de portarem diabetes MODY3. Foi encontrada uma nova mutação truncante (W113X) no éxon 2 de três pacientes aparentados, portadores de diabetes mellitus e, paralelamente, foram identificadas cinco mutações silenciosas e três mutações *missense* em pacientes diabéticos não aparentados. Estas mutações *missense* correspondem a polimorfismos já descritos na literatura e estão implicados na patogênese do diabetes, especialmente diabetes mellitus tipo 2.

ABSTRACT

The occurrence of diabetes mellitus types 1 and 2 is well documented in scientific literature. However, there are at least 6 subtypes variants of monogenic diabetes, which are called diabetes type MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), responsible for approximately 10 % of all cases of diabetes mellitus. These subtypes of diabetes show a pattern of autosomal dominant inheritance, with a precocious manifestation and not always require any kind of medication or insulin therapy for treatment. It's of extreme importance the early diagnosis of this disease, as for efficient treatment results in better prognosis for the patient. Epidemiologic studies demonstrate that between the already known forms of diabetes type MODY, the more recurrent are the ones of type 2 (mutations at the enzyme glucokinase – GCK) and 3 (mutations at the Nuclear Hepatocyte Transcription Factor 1 α - *HFN1 α*). Studies involving the identification and prevalence of subtypes of MODY at the brazilian population are scarce and poorly informative, pointing to the necessity of a detailed investigation about the occurrence of this type of diabetes. At the present study, through amplifications of the exonic regions and posterior nucleotide sequence of these, it was realized a prospect for mutations at the gene *HFN1 α* in patients from the region of Campos Gerais – PR, suspected of being carriers of diabetes MODY3. It was found a new truncating mutation (W113X) at the exon 2 in three related patients, carriers of diabetes mellitus and, parallely, were identified three silence mutations and four missense mutations in diabetic patients not related. These missense mutations correspond to polimorfisms already described in literature and are implicated at the pathogenesis of the diabetes, especially diabetes mellitus type 2.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CÉLULA β -PANCREÁTICA E PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO MODY.....	9
FIGURA 2. LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>HNF1α</i> NO GENOMA HUMANO.....	12
FIGURA 3: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO GENE <i>HNF1α</i> E SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA <i>HNF1α</i>	13
FIGURA 4. ESTRUTURA DO COMPLEXO HNF1A E DUPLA FITA DE DNA.....	16
FIGURA 5. MOTIVOS E REDES REGULATÓRIAS ENVOLVENDO HNF1A.....	17

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: RESUMO DA EVOLUÇÃO DOS CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA DIABETES PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (WHO/IDF, 2006)	2
TABELA 2: CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS DE ACORDO COM A OMS (WHO, 1999).....	3
TABELA 3. SUBTIPOS E CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES MODY	8
TABELA 4. PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS DO GENE <i>HNF1α</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ABD: Associação Brasileira de Diabetes
ADA: American Diabetes Association
AVC: acidente vascular cerebral
anti-GAD: anti-descarboxilase do ácido glutâmico
anti-IA2: anti-tirosina-fosfatase
anti-ICA: anticorpos anti-ilhota
AVC: Acidente vascular cerebral
DM: Diabetes mellitus
DM1: Diabetes mellitus tipo 1
DM2: Diabetes mellitus tipo 2
GAD: ácido glutâmico descarboxilase
GCK: enzima glicoquinase
GCK: gene da glicoquinase
GDM: Diabetes mellitus gestacional
GIGT: Deficiência gestacional da tolerância a glicose
HFN1 α : Fator Hepatocítico Nuclear 1 alfa
HNF1 α : gene do Fator Hepatocítico Nuclear 1 alfa
HbA1c: hemoglobina glicosilada
HNF4 α : Fator Hepatocítico Nuclear 4 alfa
IDF: Federação Internacional de Diabetes
TDG: tolerância diminuída a glicose
MODY: maturity onset diabetes of the young
OMS: Organização Mundial da Saúde
PCR: Reação em cadeia da polimerase
TOTG: teste oral de tolerância à glicose
WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Diagnóstico	1
1.3 Classificação	2
1.4 Diabetes mellitus tipo 1	4
1.5 Diabetes mellitus tipo 2	4
1.6 Diabetes mellitus monogênico (tipo MODY).....	5
1.7 Prevalência do diabetes tipo MODY.....	9
1.8 O gene <i>HNF1α</i>	11
1.9 A proteína HNF1α: estrutura e função	14
1.10 Diabetes tipo MODY3.....	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos específicos.....	20
3. CAPÍTULO 1.....	21
3. CAPÍTULO 2.....	25
4. DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICE	47
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
ANEXO I.....	50
ANEXO II	55
ANEXO III.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Numa definição mais ampla, a Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve o diabetes como uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não responde efetivamente à insulina produzida. Caracteriza-se pela alteração da homeostase glicêmica, com consequente distúrbio no metabolismo dos hidratos de carbono, das gorduras e das proteínas (WHO, 2009).

Em dezembro de 2010, o Ministério da Saúde apresentou dados epidemiológicos apontando para o diabetes como a terceira causa de morte no país, tendo aumentado a sua incidência em 10% de 1996 a 2007. Em primeiro lugar está o acidente vascular cerebral (AVC) e em segundo lugar as doenças coronarianas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Interessantemente, o diabetes é um dos principais fatores de risco para morte por AVC e doença coronariana. Por conta disso, o número de mortes em função do diabetes provavelmente é subestimado (SARTORELLI e FRANCO, 2003).

1.2 Diagnóstico

Assim como a classificação, os critérios para diagnóstico do diabetes vêm sendo propostos pela OMS desde 1965 (WHO, 1965) e tem sua definição mais recente publicada em 1999, em conjunto com a Federação Internacional de Diabetes (IDF) (Tabela 1) (WHO, 1999). Algumas alterações posteriores adicionaram recomendações ao relatório anterior, entre elas: *(i)* utilizar o termo “normoglicemia” para níveis de glicose associados com baixo risco de desenvolver diabetes ou doença cardiovascular (que são os níveis abaixo daqueles utilizados para definir hiperglicemia intermediária); *(ii)* utilizar a glicose do plasma venoso como padrão para mensurar e reportar as concentrações de glicose sanguíneas; *(iii)* manter o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) como diagnóstico, pois somente a análise da glicemia de jejum omite cerca de 30% dos casos de diabetes, além disso, esse teste é frequentemente necessário para confirmar ou excluir alguma anormalidade de tolerância a glicose em pacientes assintomáticos como também é o único modo de diagnosticar pessoas com TDG (tolerância diminuída à glicose) (WHO/IDF, 2006). Embora o uso da hemoglobina

glicosilada (HbA1c) não seja recomendado no relatório anterior, recentemente um grupo de especialistas indicados pela ADA e pela IDF, sugerem sua utilização como método de diagnóstico de diabetes (HbA1c $\geq 6,5\%$) e de indivíduos com necessidade de intervenção preventiva, normalmente designados de pré-diabéticos (HbA1c $\geq 6,0$ e $< 6,5\%$) (NATHAN et al., 2009). Outras deliberações, bem como as designações de desordens glicêmicas adotadas anteriormente, são mantidas.

TABELA 1: RESUMO DA EVOLUÇÃO DOS CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA DIABETES PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (WHO/IDF, 2006)

	1965	1980	1985	1999
Normal				
Glicose de jejum	não especificado	não definido	não definido	$< 6,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($< 110 \text{ mg.dL}^{-1}$)
2-h glicose	$< 6,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($< 110 \text{ mg.dL}^{-1}$)			$< 7,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ (140 mg.dL^{-1})
Diabetes				
Glicose de jejum	não especificado	$\geq 8,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($\geq 144 \text{ mg.dL}^{-1}$)	$\geq 7,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($\geq 140 \text{ mg.dL}^{-1}$)	$\geq 7,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($\geq 126 \text{ mg.dL}^{-1}$)
2-h glicose	$\geq 7,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($\geq 130 \text{ mg.dL}^{-1}$)	e/ou $\geq 11,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($\geq 198 \text{ mg.dL}^{-1}$)	ou $\geq 11,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($\geq 200 \text{ mg.dL}^{-1}$)	ou $\geq 11,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ (200 mg.dL^{-1})

Tabela 1: Resumo da evolução dos Critérios de diagnóstico para diabetes pela Organização Mundial da Saúde (WHO/IDF, 2006). Todos os valores se referem ao plasma venoso. Adaptado de WHO (2006)

1.3 Classificação

A classificação correta do diabetes mellitus (DM) proporciona rapidez na escolha do tratamento adequado. Embora a preocupação em fazer a correta distinção entre os diferentes fenótipos diabéticos remonte a década de 60, atualizações são constantes na literatura.

O primeiro manual para diagnóstico e classificação do diabetes foi publicado pela OMS, referência mundial para critérios diagnósticos de doenças, em 1965. A partir

de então, uma série de novos encontros, discussões, alterações e adendos relacionados ao diagnóstico e principalmente à classificação do diabetes foram sendo acrescentados ao primeiro manual à medida que novas informações relevantes tornavam-se disponíveis. Também é marcante o aparecimento de grupos engajados na prevenção e cura do diabetes, com destaque para a IDF, fundada em 1950 que possui representação em mais de 160 países; a Associação Americana do Diabetes (ADA), com sede nos Estados Unidos; e, no Brasil, a Associação Brasileira de Diabetes (ABD).

A classificação corrente do diabetes pela OMS data de 1999 e reflete o estágio clínico da doença e o tipo etiológico de hiperglicemia, sendo resultante da melhor compreensão das causas do diabetes (WHO, 1999; WHO/IDF, 2006; ADA, 2006) e separa-o em quatro subtipos (Tabela 2): (i) diabetes mellitus tipo 1 (insulinodependente); (ii) diabetes mellitus tipo 2 (pode ou não requerer insulino-terapia para controle metabólico); (iii) “outros tipos de diabetes” (onde estão incluídas condições bastante específicas, como defeitos genéticos que afetam a função das células β , dentre os quais está o diabetes monogênico, também chamado “tipo MODY” (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), e; (iv) diabetes gestacional, que agora abrange os grupos classificados anteriormente como Deficiência Gestacional da Tolerância a Glicose (GIGT) e Diabetes Mellitus Gestacional (GDM).

TABELA 2: CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS DE ACORDO COM A OMS (WHO, 1999).

Tipo 1	Auto-imune Idiopática
Tipo 2	
Outros tipos	Defeitos genéticos das células β Defeitos genéticos da ação da insulina Doenças do pâncreas exócrino Endocrinopatias Induzida por fármacos ou químicos Infecções Formas infrequêntes de diabetes auto-imune Outras síndromes genéticas por vezes associadas ao diabetes
Diabetes gestacional	

1.4 Diabetes mellitus tipo 1

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma das enfermidades mais frequentes da infância e adolescência representando entre 10 a 15% de todos os casos de diabetes no mundo (RUANO, 2010). Resulta de um processo de destruição das células β principalmente por um mecanismo auto-imune, no qual atuam fatores genéticos e ambientais (MORRAN et al., 2008). Como o organismo passa progressivamente a cessar a secreção endógena de insulina, a administração deste hormônio é requerida para sobrevivência a fim de impedir o desenvolvimento de cetoacidose, coma e morte.

O DM1 é caracterizado pela presença de auto-anticorpos que reagem contra duas enzimas, a descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) e a tirosina fosfatase (anti-IA2), as quais identificam o processo auto-imune associado à destruição de células β . Normalmente, um ou mais destes auto-anticorpos estão presentes em 85 a 90% dos indivíduos, quando a hiperglicemia de jejum é inicialmente detectada (GAVIN et al., 2003). O grau de destruição das células β pode ser bastante variável, ocorrendo mais rapidamente ou menos em alguns indivíduos (ZIMMET et al., 1994). Alguns pacientes, geralmente adultos, podem reter algumas células β funcionais em quantidade suficiente para prevenir a cetoacidose durante vários anos e desse modo o diabetes pode aparecer só em idades mais avançadas, embora inicie principalmente na infância e adolescência (GAVIN et al., 2003). Há ainda casos onde não há evidência de anticorpos presentes e são, por isso, classificados como idiopáticos (EKOÉ et al., 2008).

1.5 Diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais comum de diabetes e resulta de defeitos na ação e secreção de insulina, estando ambas estas características geralmente presentes, podendo uma ser dominante à outra (WHO, 2006). De acordo com a OMS, o DM2 é a terceira causa de morte no mundo, superada apenas pelas doenças cardiovasculares e pelo câncer. Calcula-se que, de cada 100 pessoas, sete sofram da doença, o que equivale mundialmente a cerca de 150 milhões de pessoas, podendo este número dobrar até 2025 (WHO, 2005). Dados da IDF (2009) indicam que a cada 10 segundos uma pessoa morre de causas relativas a diabetes e duas desenvolvem diabetes, 10% a 20% das pessoas com diabetes morrem de falha renal, aproximadamente 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por

retinopatias decorrentes de diabetes e as doenças cardiovasculares são as maiores causas de morte em diabetes, somando 50% de todas as fatalidades.

A DM2 tem se tornado grave problema de saúde pública mundial devido ao aumento exacerbado no número de casos nas últimas décadas. Tem sido observada uma elevada prevalência de intolerância à glicose e de DM2 entre certos grupos étnicos, como os Índios Pima, nativos americanos, hispano-americanos, afro-americanos, entre outros (CARTER et al., 1996). Os Índios Pima (provenientes do Arizona, Estados Unidos) apresentam a maior taxa de prevalência de diabetes no mundo, onde cerca de 50% da população entre os 30 e os 64 anos, é portadora de DM2 (PAVKOV et al., 2007). A DM2 caracteriza-se como um distúrbio multifatorial por apresentar como causas fatores ambientais aliados a fatores genéticos. Como fatores ambientais, podemos destacar estilo de vida sedentário, alimentação desbalanceada rica em gordura e carboidratos, e excesso de peso (VELHO e REIS, 2002). Atualmente, alguns variantes genéticos têm sido associados a um pequeno risco de desenvolvimento de DM2, entre os quais, variantes nos genes da calpaína-10 (*CAPN10*), da ectoenzima ENPP1, do fator de transcrição HNF4 α , do hormônio adiponectina (ADIPOQ), do receptor nuclear PPARG, do canal de potássio KCNJ11, do fator de transcrição TCF7L2, do transportador de zinco SLC30A8, e de dois blocos cromossômicos que contêm genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento e função das células β (IDE–KIF11–HHEX e EXT2–ALX4) (SLADEK et al., 2007).

1.6 Diabetes mellitus monogênico (tipo MODY)

A partir da década de 60, estudos crescentes no campo do diagnóstico clínico do diabetes trouxeram informações valiosas. Em 1960, o pesquisador americano Stefan S. Fajans, junto de colaboradores, descreveu um grupo de adolescentes não obesos com diabetes leve e bom controle com sulfoniluréias mesmo após anos de observação (FAJANS e CONN, 1960). Era a primeira descrição de indivíduos portando este tipo de diabetes, embora as características que definiriam a doença só seriam detalhadas mais de uma década depois, em 1974, por Tattersall, e o termo MODY, do inglês *Maturity Onset Diabetes of the Young*, seria adotado no ano seguinte, em 1975, publicado por Tattersall em parceria com Fajans (TATTERSALL e FAJANS, 1975).

No diabetes tipo MODY observa-se um efeito quase que exclusivamente genético, com pouca interferência dos fatores ambientais (REIS e VELHO, 2002) e

sabe-se, é resultante de mutações em um único gene. Tem sido intensamente investigado pela sua prevalência e também devido às implicações fundamentais que o diagnóstico tem no tratamento e no prognóstico dos indivíduos afetados (OLIVEIRA et al., 2002). O diabetes tipo MODY apresenta padrão de herança autossômico dominante e corresponde a uma condição monogênica de alta penetrância, visto que 95% dos indivíduos nascidos com uma mutação MODY serão diabéticos ou apresentarão alterações glicêmicas até os 55 anos de idade (FRAYLING et al., 2001). Diferentemente de pacientes com DM2, os pacientes MODY geralmente não apresentam obesidade. Todavia, a presença de acantose nigricans (o escurecimento da pele das dobras do corpo e pregas cutâneas, que se torna espessa e aveludada), ou características de síndrome metabólica devem ser alertas de uma etiologia diferente. Em resumo, as características clínicas que definem o MODY são (VAXILLAIRE e FROGEL, 2006; NYUNT et al., 2009):

- Idade de aparecimento do diabetes geralmente antes dos 25 anos de idade com ao menos um e idealmente dois familiares afetados;
- Ausência de auto-anticorpos pancreáticos: anticorpos que reagem contra antígenos próprios relacionados ao pâncreas - anticorpos anti-ilhota (anti-ICA); anti-GAD; e anti-IA2;
- Não insulino-dependência, mostrada pela ausência de tratamento insulínico cinco anos após o diagnóstico da doença (ou significante peptídeo C-circulante, um subproduto da degradação da pró-insulina que é co-secretado junto com a insulina pela célula β -pancreática, mesmo em pacientes em tratamento insulínico);
- Herança autossômica dominante;
- Rara associação com obesidade.

Apesar das caracterizações muitas vezes detalhadas, rotineiramente são observadas sobreposições de quadros intermediários de DM1 e de DM2 (principalmente no DM2 que inicia no adulto jovem ou que se apresenta inicialmente com cetoacidose) ao MODY, dificultando o controle da saúde dos pacientes. Além disso, algumas formas de DM identificados nas últimas décadas, intermediários aos tipos 1 e 2, não se encaixam na classificação da ADA e da OMS, tendo particularidades em sua história natural e necessidade de tratamento com insulina (MARASCHIN et al., 2010).

Por vezes, alguns pacientes MODY são erroneamente diagnosticados como tendo diabetes tipo 1 por apresentarem sintomas osmóticos (sede, poliúria e noctúria) na segunda ou terceira década de vida, pelo aparecimento precoce da doença e/ou por geralmente não apresentarem obesidade. Dessa maneira, o diagnóstico adequado deve reunir as características clínicas, os dados do histórico familiar e testes laboratoriais (OWEN e HATTERSLEY, 2001).

O fenótipo dos pacientes caracteriza-se por uma hiperglicemia crônica de origem não auto-imune, e nas formas mais graves pode acarretar o desenvolvimento de complicações crônicas degenerativas da mesma forma que no DM2 clássico de início mais tardio. Do ponto de vista biológico, os pacientes portadores de MODY apresentam concentrações normais ou baixas de insulina, demonstrando uma anomalia primária na secreção deste hormônio (FROGUEL e VELHO, 1994; FROGUEL e VELHO, 1999).

Na Europa e na América do Norte já são bem conhecidas e empregadas as metodologias para a detecção das mutações, onde em aproximadamente 85% dos casos analisados se tem o diagnóstico do subtipo de MODY. O diagnóstico genético é considerado relativamente fácil de ser realizado e a determinação exata do subtipo que o paciente é portador é extremamente importante para um tratamento correto dos indivíduos afetados. Além disso, um diagnóstico precoce desta doença se reveste de importância visto que a adoção simples de um estilo de vida mais saudável, como aconselhado em pacientes com diabetes MODY tipo 2, por exemplo, poderia levar a um retardo na progressão da doença (OWEN e HATTERSLEY, 2001).

Atualmente, são amplamente aceitos seis subtipos de MODY, relacionados a mutações em seis genes diferentes, mas a lista tem crescido para nove (NYUNT et al., 2009) e acredita-se na existência de vários outros, ainda não identificados, denominados de MODY "X" (CHÈVRE et al., 1998). No geral, estes genes foram descobertos por clonagem posicional e análises genéticas de associação de gene candidato em famílias portadoras de mutação. As proteínas codificadas por estes genes estão envolvidas no metabolismo da glicose, como a enzima responsável pelo MODY2, glicoquinase (GCK) (FROGUEL et al., 1993), ou são fatores de transcrição presentes nas células β -pancreáticas que influenciam a expressão do gene da insulina. Estes fatores incluem: o Fator Hepatocítico Nuclear 4 α (MODY1) (YAMAGATA et al., 1996); Fator Hepatocítico Nuclear 1 α (MODY3) (YAMAGATA et al., 1996); Fator Promotor da Insulina (MODY4) (STOFFERS et al., 1997); Fator Hepatocítico Nuclear 1 β (MODY5)

(HORIKAWA, et al., 1997) e NeuroD1/ β 2 (MODY6) (MALECKI, et al., 1999) (Tabela 3).

TABELA 3. SUBTIPOS E CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES MODY

	MODY1	MODY2	MODY3	MODY4	MODY5	MODY6
Locus genético	20q	7p	12q	13q	17q	2q32
Gene	<i>HNF4α</i>	<i>GCK</i>	<i>HNF1α</i>	<i>IPF1</i>	<i>HNF1B</i>	<i>NeuroD1/β2</i>
Função	Fator de transcrição	Enzima	Fator de transcrição	Fator de transcrição	Fator de transcrição	Fator de transcrição
Frequência	Rara	8-65% ^a	20-75% ^a	Rara	Rara	Rara
Severidade	Severa	Leve	Severa	Severa	Severa	Severa
Fenótipo	Macrossomia, hipoglicemia transitória hiperinsulinêmica, hiperlipidemia familiar, sensibilidade aumentada a sulfonilureias	Deficiência leve de insulina, baixo peso ao nascer(mães não-afetadas), diabetes mellitus neonatal em homozigose	Insuficiência pancreática exócrina, sensibilidade aumentada a sulfonilureias, glicosúria	Agenesia Pancreática	Anomalias congênitas do trato urinário, agenesia da cauda e corpo pancreáticos, insuficiência pancreática exócrina	Anomalias pancreáticas
Ano de descoberta (referência)	YAMAGATA et al., 1996	FROGEL et al., 1992	YAMAGATA et al., 1996	STOFFERS et al., 1997	HORIKAWA, et al., 1997	MALECKI, et al., 1999

^aDistribuição em diferentes populações

Estes genes são expressos principalmente nas células β -pancreáticas causando sua disfunção quando mutados, mas também no fígado e rim, podendo ocorrer anormalidades nestes órgãos (BELL e POLONSKY, 2001). A figura 1 traz uma representação esquemática de uma célula β -pancreática mostrando as proteínas associadas ao MODY.

É comum entre as descrições das classes de diabetes encontrar a colocação de que o diabetes monogênico “é caracterizado pelo aparecimento de hiperglicemia leve em idade precoce, frequentemente antes do 25 anos”. Essa concepção, como ressaltado por Fajans (1998), pode perpetuar o entendimento errôneo de que o MODY é caracterizado por hiperglicemia leve. Essa característica não é comum a todos os tipos de MODY. MODY1 e 3, por exemplo, estão associados com hiperglicemia leve de

jejum no diagnóstico, mas cerca de 30% destes pacientes acabam requerendo insulina ou agentes hipoglicemiantes para tratamento clínico.

FIGURA 1. CÉLULA β -PANCREÁTICA E PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO MODY

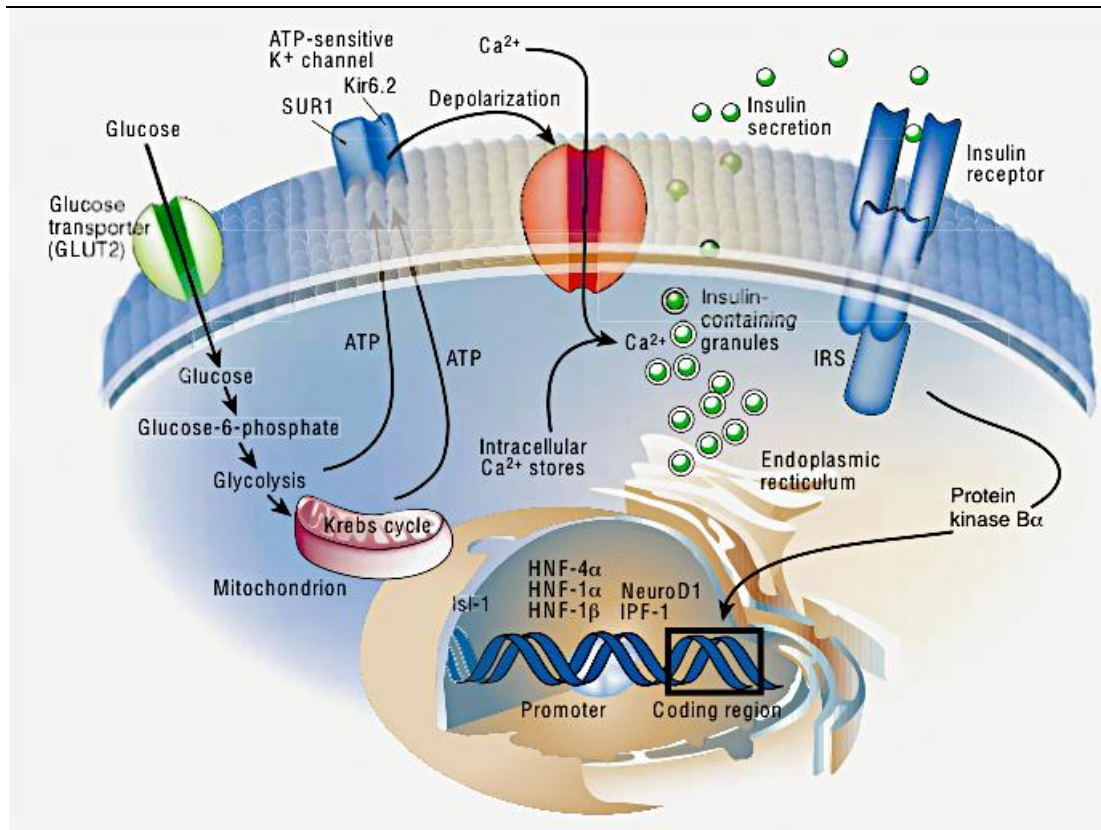


Figura 1. Célula β -pancreática e proteínas associadas ao MODY. Glicose é transportada para dentro da célula β através do transportador de glicose tipo 2 (GLUT2). A enzima glicocinase age como um sensor de glicose para a célula β e catalisa a transferência de fosfato do ATP para a glicose para formar glicose-6-fosfato (e, quando mutada, conduz ao MODY2). A geração de ATP pela glicólise e Ciclo de Krebs conduz ao fechamento dos canais de K^+ sensíveis a ATP - um hetero-octâmero composto por quatro subunidades do receptor 1 de sulfonilureia (SUR1) e quatro subunidades dos retificadores internos de canal de K Kir6.2. Mutações nestas proteínas estão associadas com hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar persistente da infância. O fechamento dos canais de K^+ sensíveis a ATP conduz à despolarização da membrana plasmática e influxo de cálcio extracelular que junto do cálcio mobilizado a partir das vesículas intracelulares, levam a fusão dos grânulos secretórios contendo insulina com a membrana plasmática e consequente liberação de insulina na circulação. A célula β possui receptores para insulina e há evidências para uma ação autócrina da insulina na função da célula β , incluindo transcrição da glicocinase e genes da insulina. Os fatores de transcrição HNF4 α (MODY1), HNF1 α (MODY3), HNF1 β (MODY5), IPF-1 (MODY4) e NeuroD1/ β 2 (MODY6) regulam a transcrição da insulina e outros genes da célula β . Adaptado de Bell e Polonsky, 2001.

1.7 Prevalência do diabetes tipo MODY

Estima-se que cerca de 5% dos indivíduos previamente classificados como DM2 e cerca de 10% daqueles classificados como DM1 sejam, na verdade, portadores de mutações MODY (OLIVEIRA et al., 2002).

A primeira descrição de pacientes portadores de MODY1 é atribuída a Fajans e colaboradores (1989), através do estudo de uma família de mais de 360 membros, ao longo de seis gerações. Contudo, estudos apontando mutações no gene *HNF4α* (20q13) como causais para o MODY1 só foram descritos quase 10 anos depois, por Yamagata e colaboradores (1996). É uma forma pouco frequente representando em torno de 1 a 3% de todos os casos de diabetes MODY.

O gene da glicocinase era um candidato óbvio para o diabetes por seu papel fundamental no metabolismo dos carboidratos (OWEN e HATTERSLEY, 2001). Sua primeira descrição foi feita em 1992, por Froguel e colaboradores, a partir de 16 famílias francesas. Do ponto de vista clínico, os portadores de mutações MODY2 apresentam diabetes leve e a grande maioria destes pacientes evolui para um bom controle metabólico apenas com medidas dietéticas (OLIVEIRA et al., 2002). É um dos subtipos de MODY mais frequentes, representando entre 8 e 63% dos casos, dependendo da população estudada (VAXILLAIRE e FROGUEL, 2006; RUANO, 2010).

MODY2 e MODY3 são os subtipos MODY mais bem estudados e mais prevalentes nas populações estudadas. Os casos de MODY3 somam entre 20 e 75% (VAXILLAIRE e FROGUEL, 2006) e são semelhantes ao MODY1 em características, complicações e severidade.

Há apenas um estudo familiar completo sobre o variante MODY4 (STOFFERS et al., 1997). É uma forma rara de diabetes causada por mutações no gene do Fator Promotor de Insulina (IPF1). Este fator está envolvido na regulação da secreção de insulina e no desenvolvimento do pâncreas e mutações em homozigose são responsáveis por agênese pancreática (STOFFERS et al., 1997).

O gene *HNF1β* foi identificado por Horikawa e colaboradores em 1997. Seu produto gênico é um fator de transcrição envolvido na organogênese do trato genital e urinário, do fígado, ductos biliares e pâncreas (OLEK et al., 2006). Mutações neste gene são responsáveis pelo MODY5, que compreende uma disfunção de apresentação rara caracterizada por um amplo espectro clínico diabético, atrofia pancreática com deficiência exócrina subclínica, nefropatia não-diabética progressiva, malformações renais e genitais e anormalidades do fígado (BELLANNÉ-CHANTELOT et al., 2004).

MODY6 foi descrito por Malecki e colaboradores (1999), é causado por mutações no gene *NEUROD1/β2* e tem características clínicas semelhantes ao MODY3. Até hoje, MODY6 foi reportado em apenas três famílias (SAGEN et al., 2006).

Para cerca de 16 a 45% dos casos de MODY não há locus associado, são os chamados “MODY X” (CHÈVRE et al., 1998).

No Brasil, poucos estudos relacionados aos subtipos MODY foram realizados até o presente e as investigações foram restritas ao MODY2 e MODY3 (MARASCHIN et al., 2008; FURUZAWA et al., 2008) ou incluíram também o MODY1 (MOISES et al., 2001). Em função apenas destes dados preliminares, seria tendencioso avaliar a prevalência de MODY na população brasileira e sendo assim, as estimativas permanecem incógnitas.

1.8 O gene *HNF1α*

O fator de transcrição *HNF1α* foi descrito pela primeira vez em 1987 por Courtois e colaboradores, como um regulador transcricional de importantes genes hepáticos, como o gene da albumina, da α 1-antitripsina e do fibrinogênio, recebendo o nome de Fator Hepatocítico Nuclear 1 α .

Sua associação ao MODY3 só ocorreu quase dez anos depois, quando em 1995 Vaxillaire e colaboradores, a partir de análise de segregação de marcadores microssatélites numa abordagem com o genoma inteiro, localizaram um *locus* no cromossomo 12q em famílias francesas (VAXILLAIRE et al., 1995). Yamagata e colaboradores (1996), um ano mais tarde, apontaram o gene *HNF1α* como responsável pelo MODY3. Sua expressão é regulada pelo gene *HNF4α* (Fator Hepatocítico Nuclear 4 alfa), que causa o MODY1 e, por isso, os mecanismos por trás destas formas de MODY provavelmente são similares (FAJANS et al., 2001).

O gene *HNF1α* está localizado no braço longo do cromossomo 12, na posição 12q24.2 (Figura 2) e se estende ao longo de 23kb, possui dez éxons (Figura 3) e dois sítios de poliadenilação no extremo 3', que junto do processamento alternativo dos éxons 6 e 7, podem gerar três isoformas diferentes A, B e C (BACH et al., 1990). A isoforma A contém todos os 10 éxons e se expressa no fígado, rim, intestino e pâncreas fetal; a isoforma B surge por processamento em um dos sítios de poliadenilação, compreende os éxons 1 a 7 e é expressa nas ilhotas pancreáticas e, a isoforma C é gerada por processamento do outro sítio de poliadenilação reunindo os éxons 1 a 6

(BELLANNÉ-CHANTELOT et al., 2008). Estudos de transativação sugerem que todas as três isoformas tem atividade, B e C têm uma capacidade ativadora de transcrição cerca de cinco vezes maior que A, mas apesar disso, apenas a isoforma A tem seu perfil de expressão bem definido (HARRIES et al., 2006).

FIGURA 2. LOCALIZAÇÃO DO GENE *HNF1 α* NO GENOMA HUMANO

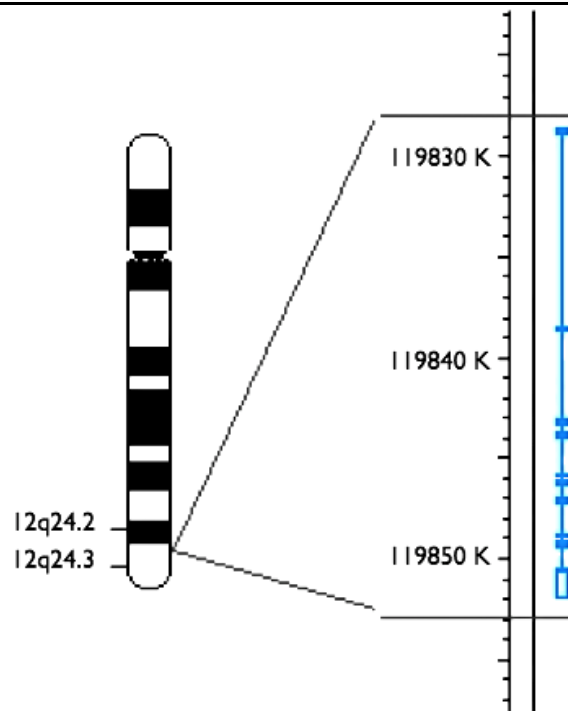


Figura 2. Localização do gene *HNF1 α* no genoma humano. A partir do cromossomo 12q o gene se estende entre 119,800 kb e 119,880 kb, aproximadamente. O esquema evidencia a posição relativa dos éxons como caixas preenchidas (em azul).

FIGURA 3: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO GENE *HNF1 α* E SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HNF1 α

A

ATGGTTTCTAAACTGAGCCAGCTGCAGACGGAGCTCCTGGCGGCCCTGCTCGAGTCAGGGCTGAGCAAAGA
 GGCCTGATCCAGGCACTGGGTGAGCCGGGGCCCTACCTCCTGGCTGGAGAAGGCCCCCTGGACAAGGGGG
 AGTCCTGCGGCGGGCTCGAGGGGAGCTGGCTGAGCTGCCAATGGGCTGGGGGAGACTCGGGGCTCCGAG
 GACGAGACGGACGACGATGGGGAAGACTTCACGCCACCCATCCTCAAAGAGCTGGAGAACCTCAGCCCTGA
 GGAGGCGGCCACCAGAAAAGCCGTGGTGGAGACCCTTCTGCA**GGAGGACCCGTGGCGTGTGGCGAAGATGG**
TCAAGTCTACCTGCAGCAGCACAAATCCACAGCGGGAGGTGGTCGATACCACTGGCCTCAACCAGTCC
CACCTGTCCCAACACCTCAACAAGGGCACTCCCATGAAGACGCAGAAGCGGGCCGCCCTGTACACCTGGTA
CGTCCGCAAGCAGCGAGAGGTGGCGCAGCAGTTACCCATGCAGGGCAGGGAGGGCTGATTGAAGAGCCCA
 CAGGTGATGAGCTACCAACCAAGAAGGGGCGGAGGAACCGTTTCAAGTGGGGCCAGCATCCCAGCAGATC
 CTGTTCCAGGCCTATGAGAGGCAGAAGAACCCTAGCAAGGAGGAGCGAGAGACGCTAGTGGAGGAGTGCAA
 TAGGGCGGAATGCATCCAGAGAGGGGTGTCCCATCACAGGCACAGGGGCTGGGCTCCAACCTCGTCACGG
 AGGTGCGTGTCTACAACCTGGTTTGCCAACCGGCGCAAAGAAGAAGCCTTCCGGCACAAGCTGGCCATGGAC
 ACGTACAGCGGGCCCCCCCCAGGGCCAGGCCCGGGACCTGCGCTGCCCGCTCACAGCTCCCCCTGGCCTGCC
 TCCACCTGCCCTCTCCCCAGTAAGGTCCACGGTGTGCGCTATGGACAGCCTGCGACCAGTGAGACTGCAG
 AAGTACCCTCAAGCAGCGGCGGTCCCTTAGTGACAGTGTCTACACCCCTCCACCAAGTGTCCCCACGGGC
 CTGGAGCCAGCCACAGCCTGCTGAGTACAGAAGCCAAGCTG**GTCTCAGCAGCTGGGGGCCCTCCCCC**
TGTCAGCACCTGCAGCACTGCACAGCTTGGAGCAGACATCCCAGGCCTCAACCAGCAGCCCCAGAACC
TCATCATGGCCTCACTTCTGGGGTCATGACCATCGGGCCTGGTGAGCCTGCCTCCCTGGGTCTACGTTT
ACCAACACAGGTGCCTCCACCTGGTCATCGGCCTGGCCTCCACGCAGGCACAGAGTGTGCCGGTCATCAA
 CAGCATGGGCAGCAGCCTGACCACCTGCAGCCCGTCCAGTTCTCCAGCCGCTGCACCCCTCCTACCAGC
 AGCCGCTCATGCCACCTGTGCAGAGCCATGTGACCCAGAGCCCTTCATGGCCACCATGGCTCAGCTGCAG
 AGCCCCACG**CCCTCTACAGCCACAAGCCCCGAGGTGGCCAGTACACCCACACGGGCCTGCTCCCGCAGAC**
TATGCTCATACCGACACCACCAACCTGAGCGCCCTGGCCAGCCTCACGCCACCAAGCAGGTCTTACCT
 CAGACACTGAGGCCTCCAGTGAGTCCGGGCTTACACGCCGGCATCTCAGGCCACCACCTCCACGTCCCC
 AGCCAGGACCCTGCCGGCATCCAGCACCTGCAGCCGGCCACCGGCTCAGCGCCAGCCCCACAG**TGTCCTC**
CAGCAGCCTGGTGTGTACCAGAGCTCAGACTCCAGCAATGGCCAGAGCCACCTGCTGCCATCCAACCACA
GCGTCATCGAGACCTTCATCTCACCCAGATGGCCTCTTCCCTCCAGTAA

B

MVSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALIQA**L**GEPPGYLLAGEGPLDKGESCGGGRGELAE**L**PNG**L**GETRGSE
 DETDDDGEDFT**P**PI**L**KELENLSPEEAAHQKAVVET**L****L****Q**ED**P**WRVAKMVKS**Y**L**Q**QHNI**P**QREVVD**T**T**GL**N**S**
HLS**Q**HLNKG**T**PMKT**Q**KRAAL**Y**TWYVRK**Q**REVA**Q****Q**FTHAG**Q**GLIEEPTGDEL**P**TKKGRNR**F**KWGPAS**Q**Q**I**
 LFQAYER**Q**KNPSKEERETLVEECN**R**A**E**CI**Q**RGV**S**PS**Q**A**Q**GL**S**N**L**VTEV**R**V**Y**N**W**FANRR**K**EE**A**FR**H**KL**A**M**D**
TYSG**P**PP**G**PG**P**AL**P**AHSS**P**GL**P**PP**A**LS**P**SK**V**H**G**VRY**G**Q**P**AT**S**E**T**A**E**VPSS**S**GG**P**LV**T**V**S**T**P**L**H**Q**V**S**P**T**G**
 L**E**PS**H**LL**S**TEAK**L**V**S**AAG**G**PL**P**VP**S**T**L**TAL**H**S**L**E**Q**T**S**PL**N**Q**Q**P**Q**N**L**IMAS**L**PG**V**M**T**IG**P**GE**P**AS**L**GP**T**F
TNT**G**AST**L**VI**G**LAST**Q**A**Q**SV**P**V**I**NS**M**GS**S**L**T**TL**Q**P**V**Q**F**S**Q**PL**H**PS**Y**Q**Q**PL**M**PP**V**Q**S**H**V**T**Q**SP**F**MAT**M**A**Q**L**Q**
 SP**H**AL**Y**SH**K**PEVA**Q**Y**T**HT**G**LL**P**Q**T**ML**I**T**D**T**N**LSALAS**L**T**P**T**K**Q**V**F**T**SD**E**ASSE**S**GL**H**T**P**AS**Q**AT**L**L**H**V**P**
 SQ**D**PAG**I**Q**H**L**Q**PA**H**RL**S**AS**P**T**V**SS**S**SL**V**LY**Q**SS**D**SS**N**G**S**HL**L**PS**N**HS**V**I**E**T**F**I**S**T**Q**MA**S**S**S**Q

Figura 3: Sequência nucleotídica do gene *HNF1 α* e sequência de aminoácidos da proteína HNF1 α . A: Sequência dos 1896 nucleotídeos do gene *HNF1 α* . A cor azul alterna os diferentes éxons. B: Sequência dos 631 aminoácidos da proteína HNF1 α . O destaque vermelho indica aminoácidos codificados ao redor de junções de processamento (*splicing*).

Já foram descritas mais de 300 diferentes mutações (EIDE et al., 2008) distribuídas ao longo de todo o gene e região promotora estando concentradas nos éxons 2 e 4 e em menor número, nos éxons 5 e 10 (ELLARD e COLCLOUGH, 2006). De acordo com Ellard (2000), 43,5% das mutações de ponto no gene *HNF1 α* são deaminações de metilcitosinas nos dinucleotídeos CpG.

A mutação mais comum, observada em diversas famílias e sugerindo um *hot spot* de mutação no gene, é a Pro291fs no trato policitosina (trato poli C) do éxon 4. O trato poli C consiste de oito ou nove citosinas, dependendo do polimorfismo no códon 288. De modo que bases repetidas são propensas a deleções ou duplicações pelo fenômeno de deslizamento de uma das fitas do DNA na forquilha de replicação (*Slip Strand Mismatching*), essa região é um alvo potencial de mutações e é provável que cada família represente um evento isolado de mutação espontânea (ELLARD e COLCLOUGH, 2006). Esta mutação provoca mudança na matriz de leitura do RNAm conduzindo a uma proteína truncada onde a maioria do domínio de transativação está ausente (YAMAGATA et al., 1998).

Polimorfismos também têm sido encontrados com bastante frequência no gene *HNF1 α* , sendo que 15 destes correspondem a substituições não sinônimas de aminoácidos (ELLARD e COLCLOUGH, 2006). Os principais variantes polimórficos encontram-se nos códons 27 (I21L), 98 (A98V) e 487 (S487N) (RUANO, 2010). Embora alguns estudos apontem para relevância destes variantes no desenvolvimento do diabetes, o significado biológico destes polimorfismos permanece sob investigação.

1.9 A proteína HNF1 α : estrutura e função

A proteína Fator Hepatocítico Nuclear 1- α é um ativador transcricional que foi inicialmente encontrado envolvido na regulação de um grande conjunto de genes hepáticos (COURTOIS et al., 1987). Pertence a uma rede de fatores transcricionais que coordenam a expressão de uma gama de genes no fígado, rins, pâncreas e intestino (DEAN e MCENTYRE, 2004; PONTOGLIO et al., 2000). No embrião, esta rede de proteínas nucleares guia o desenvolvimento do fígado e continua a ter importância no indivíduo adulto; muitas funções aparecem ou desaparecem dependendo da expressão destes fatores de transcrição (DEAN e MCENTYRE, 2004). A proteína HNF1 α se liga a sequências requeridas para um funcionamento ótimo de uma variedade de genes que são expressos exclusivamente no fígado, tais como fibrinogênio alfa e beta, albumina, alfa-fetoproteína, alfa-1-antitripsina, piruvato quinase hepática, transtiretina e aldolase B (COURTOIS et al., 1987).

É uma proteína homeodomínio (PONTOGLIO et al., 2000), ou seja, possui um motivo de ligação ao DNA que é codificado por uma sequência conservada de cerca de 180 pares de bases (*homeobox*) (ALBERTS et al., 2001). Estruturalmente, a proteína

possui três domínios: um domínio de dimerização amino-terminal responsável pela ligação e dimerização ao DNA (primeiros 32 resíduos), que permite homodimerização ou heterodimerização com as proteínas HNF1 β (RYFFEL, 2001); um domínio de ligação ao DNA e um domínio de transativação na região C-terminal (PONTOGLIO et al., 2000). O domínio de transativação é a região ativadora de transcrição do DNA, uma região rica em serinas e treoninas (BACH e YANIV, 1993).

O domínio de ligação ao DNA consta de um homeodomínio clássico de sequência conservada compreendendo os resíduos 203-276 (domínio POU_H) e um segundo domínio estruturalmente semelhante aos domínios POU-específicos que compreende os aminoácidos 91-185 (domínio POU_S), não predito pela sequência de aminoácidos, mas identificado por Chi e colaboradores (2002), através de cristalização de proteínas. POU_H é um domínio mais compacto formado por três α -hélices, enquanto POU_S é menos compacto e possui cinco α -hélices (CHI et al., 2002). Mutações nestas regiões conduzem ao MODY principalmente por afetar a ligação de HNF1 α ao DNA, por afetar a interação entre os domínios POU_H e POU_S, por afetar a estabilidade protéica ou por afetar a localização nuclear (CHI et al., 2002). A transativação danificada do gene da insulina aliada a um desenvolvimento anormal das ilhotas pancreáticas durante a vida fetal, limitando as funções da célula beta no adulto também devem estar implicados (ELLARD, 2000). A figura 4 traz um esquema da estrutura de HNF1 α ligado a dupla fita de DNA.

Muitos dos achados sobre a função de HNF1 α vieram de modelos murinos ou de estudos *in vitro*. A observação de que camundongos nulos para *HNF1 α* são diabéticos e sofrem de síndrome renal de Fanconi (uma doença que afeta os túbulos proximais caracterizada entre outras manifestações, por glicosúria), por exemplo, norteou o achado de que HNF1 α controla a expressão do gene *SGLT2*, um co-transportador responsável pela reabsorção renal de glicose auxiliando a esclarecer o fato de que pacientes MODY3 apresentam reduzida capacidade de reabsorção tubular renal proximal de glicose (PONTOGLIO et al., 2000).

FIGURA 4. ESTRUTURA DO COMPLEXO HNF1A E DUPLA FITA DE DNA

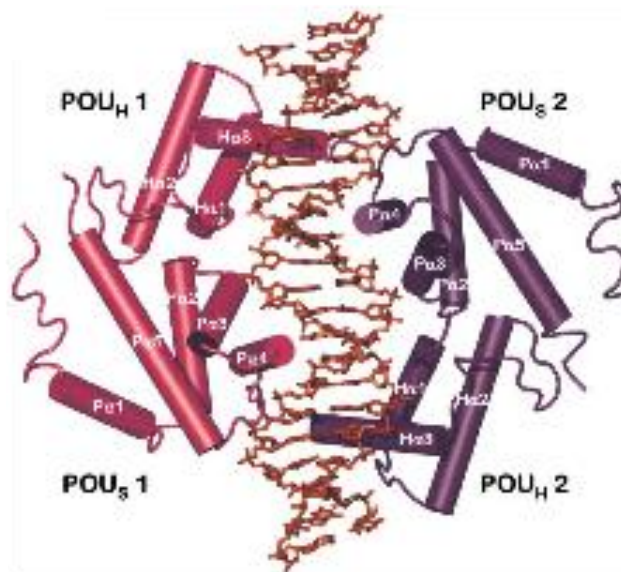


Figura 4: Estrutura do complexo HNF1 α e dupla fita de DNA. Duas proteínas (1 e 2) estão ligadas ao DNA (ao centro). As cinco α -hélices de cada domínio POU_S e as três α -hélices de cada domínio POU_H são marcadas como P α 1-5 e H α 1-3, respectivamente. Adaptado de Chi et al., 2002.

Mais recentemente, um estudo *in vitro* demonstrou que a ausência de HNF1 α está relacionada com um declínio da massa celular de células β e aumento da apoptose celular por diminuir a sinalização da proteína quinase mTOR. Esta proteína faz parte dos complexos TORC1 e TORC2 que participam da rota de sinalização do fosfatidilinositol 3-fosfato e de AKT1, proteínas implicadas no crescimento celular e apoptose (FARRELLY et al., 2009). Outro estudo *in vitro* sugere HNF1 α como o principal regulador da função das células β por ser necessário para a expressão do transportador GLUT2, da proteína piruvato-quinase (PK-L) e de insulina nas células β (BOJ et al., 2001). Além disso, a expressão de vários outros fatores de transcrição que participam de redes complexas de ativação e inibição de transcrição, como HNF3 γ y HNF4 γ e HNF4 α são regulados direta ou indiretamente por HNF1 α (BOJ et al., 2001).

Odom e colaboradores (2004), usando imunoprecipitação de cromatina e ensaio com microarranjos de DNA, encontraram que HNF1 α está relacionado a pelo menos 222 genes alvo nos hepatócitos e identificaram circuitos regulatórios tecido-específicos formados por HNF1 α , HNF4 α , e HNF6 com outros fatores transcricionais revelando como estes fatores funcionam como principais reguladores dos hepatócitos e da transcrição nas ilhotas pancreáticas. A figura 5 apresenta um resumo das redes reguladoras da transcrição envolvidas com a proteína HNF1 α .

FIGURA 5. MOTIVOS E REDES REGULATÓRIAS ENVOLVENDO HNF1A

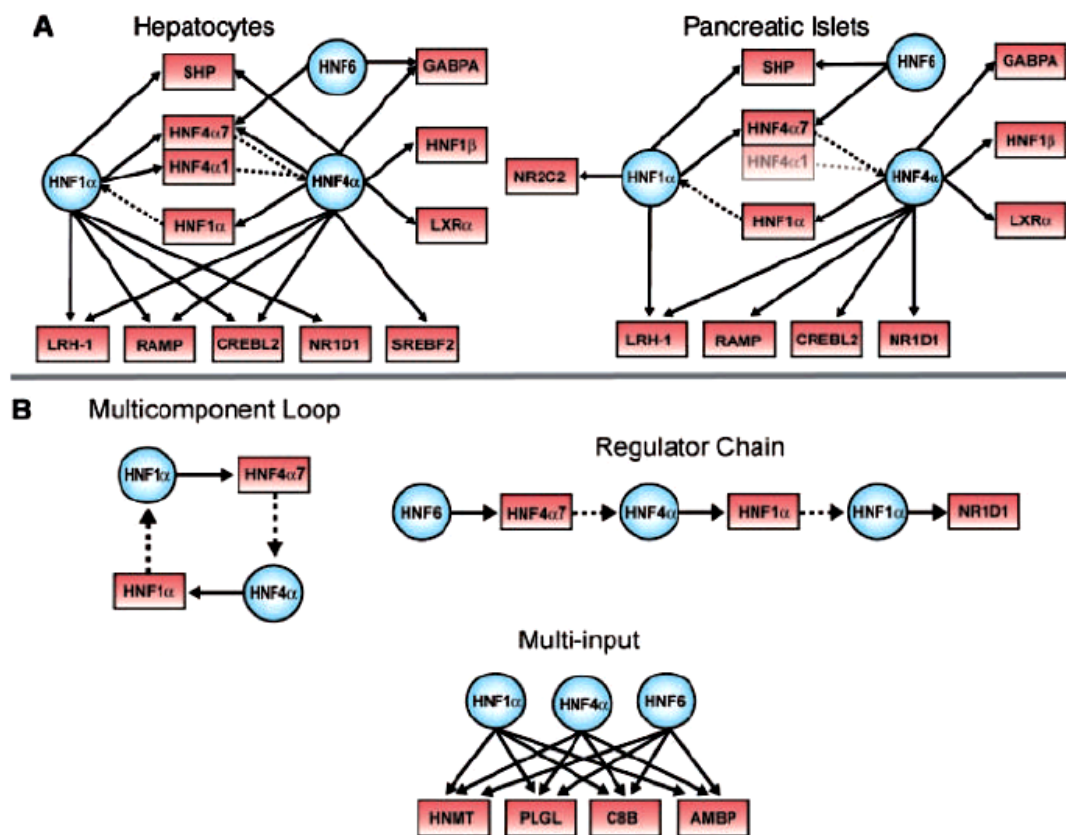


Figura 5. Motivos e redes regulatórias envolvendo HNF1a. Proteínas estão representadas como círculos azuis e seus genes alvo como caixas vermelhas. Setas preenchidas indicam interação proteína-DNA e genes codificando reguladores estão ligados a seus produtos proteicos por setas pontilhadas. (A) Nos hepatócitos, HNF1α, junto de HNF6 e HNF4α são o centro da rede regulatória da transcrição. HNF4α1 é pobremente expresso e por isso aparece desbotado na figura. (B) Exemplos dos motivos regulatórios nos hepatócitos: em *Multicomponent Loop*, a proteína HNF1α se liga ao promotor do gene *HNF4α* e a proteína HNF4α se liga ao promotor do gene *HNF1α*. Adaptado de Odom et al., 2004.

1.10 Diabetes tipo MODY3

O gene *HNF1a* foi identificado como causador de MODY3, quando mutado, por Yamagata e colaboradores, em 1996. Fajans e Bell (2006) reportam que a história natural do MODY3 pode variar entre indivíduos diferentes, alguns são eficientemente tratados com agentes orais por muitas décadas, mas aproximadamente 35% acabam requerendo insulina para o controle da hiperglicemia. Essa heterogeneidade fenotípica pode ocorrer dentro de uma mesma família e até entre irmãos. Sobre a razão para esta expressão diferenciada, oposta ao que se observa em tipos mais leves de MODY, como

o MODY2, onde o padrão clínico é sempre muito semelhante, especula-se que deva haver outros genes moduladores que irão determinar para cada indivíduo a gravidade do diabetes e a deficiência secretória da insulina em resposta à glicose (OLIVEIRA et al., 2002). Entretanto, alguns estudos (BELLANNÉ-CHANTELOT, 2008; FAJANS e BELL, 2006) têm sugerido que parte da variabilidade da expressão clínica em pacientes MODY3 pode ser explicada pelo tipo e localização das mutações no gene *HNF1α*. Como exemplo, Bellanné-Chantelot e colaboradores (2008) encontraram que a idade de diagnóstico do diabetes é menor em pacientes com mutações que causam truncagem da proteína (término abrupto da transcrição gerando uma proteína encurtada), do que naqueles com mutações de sentido trocado (*missense*).

Pacientes que apresentam MODY tipo 3 desenvolvem hiperglicemia progressiva grave, são incapazes de aumentar a secreção de insulina em um estado pós prandial (FRAYLING et al., 1997) e frequentemente desenvolvem complicações microvasculares (OWEN e HATTERSLEY, 2001). Até os 55 anos de idade, quase 100% dos indivíduos nascidos com mutações no gene *HNF1α* serão diabéticos (FRAYLING et al., 2001).

Indivíduos diabéticos não insulino-dependentes são usualmente tratados como pacientes portadores de DM2 por não receberem diagnóstico adequado ou por não haver evidências suficientes que justifiquem um tratamento alternativo (PEARSON et al., 2003). Apesar de existirem seis subtipos de MODY já bem documentados, o MODY3 têm se mostrado recorrente em todos os grupos já estudados. Pacientes com MODY3 podem requerer tratamento com insulina. Person e colaboradores (2003), num ensaio pioneiro, encontraram que as causas da hiperglicemia mudam a resposta às drogas hipoglicêmicas e mostraram que indivíduos com mutações *HNF1α* têm sensibilidade marcante às sulfonilureias mostrando bom controle glicêmico com tais drogas.

O diagnóstico clínico relativamente fácil de ser realizado aponta para a necessidade da determinação exata do subtipo MODY de cada paciente, pois esta definição tem repercussões óbvias na escolha correta do tratamento e significativo impacto na conduta clínica, permitindo um prognóstico mais adequado e oferecendo a possibilidade de identificar membros da família com risco de apresentar mutação. O diagnóstico de outros familiares que desconheçam sua condição propicia o emprego do tratamento precoce, o que certamente previne o surgimento de complicações crônicas secundárias ao mau controle metabólico (HATTERSLEY, 2000).

Estudos populacionais envolvendo a identificação e prevalência de subtipos de MODY na população brasileira são muito escassos, pouco informativos e mesmo controversos. Estes dados, comparados, são inconclusivos e apontam para a necessidade de uma investigação minuciosa sobre a ocorrência deste tipo de diabetes no Brasil. Neste sentido, um estudo com indivíduos portadores de diabetes na população da região dos Campos Gerais do Paraná reveste-se de importância direta aos pacientes analisados e para a saúde pública no tocante a necessidade de um estudo epidemiológico e gestão da saúde. Em adição, o pool gênico miscigenado típico da população brasileira se apresenta como uma incógnita para a frequência e prevalência de mutações MODY já conhecidas e ainda em relação a novas mutações.

2. OBJETIVOS

Observados os benefícios de testes genéticos no diagnóstico de MODY e na conduta clínica proporcionados aos pacientes e seus familiares, além da carência de estudos acerca da prevalência de diabetes tipo MODY no Brasil, o presente trabalho propôs prospectar mutações no gene envolvido com o diabetes tipo MODY3 em pacientes na região dos Campos Gerais do Paraná.

2.1 Objetivos específicos

- a). Obter grupo populacional de pacientes com diagnóstico clínico de diabetes tipo MODY na região dos Campos Gerais do Paraná;
- b). Sequenciar os 10 éxons do gene *HNF1 α* de pacientes apresentando diagnóstico clínico de diabetes tipo MODY;
- c). Prospectar e caracterizar as mutações encontradas nas regiões sequenciadas comparando-as com as sequências conhecidas, depositadas em banco de dados (*GenBank*) e discutir suas implicações clínicas.
- d). Comparar os dados obtidos com os dados presentes na literatura.

Os resultados obtidos neste trabalho foram divididos na forma de dois capítulos organizados como artigos científicos: o capítulo 1 foi aceito para publicação na revista *Clinics* e o capítulo 2 encontra-se em vias de submissão.

3. CAPÍTULO 1

Nova mutação sem-sentido *HNF1α* é causa de *Maturity-Onset Diabetes of the Young* tipo 3.

Resumo

Dentre as formas monogênicas de diabetes mellitus (DM), o *Maturity-Onset Diabetes of the Young type 3* (MODY3) é a mais recorrente entre as populações já estudadas. Mutações no gene *HNF1α*, o qual codifica um fator de transcrição ligado a expressão do gene da insulina, são responsáveis por este subtipo de diabetes considerado grave e progressivo. Neste trabalho, foi realizada uma prospecção por mutações no gene *HNF1α* em membros de uma família da região sul do Brasil através da amplificação dos éxons e posterior sequenciamento destes fragmentos. Foi detectada uma mutação, ainda não descrita na literatura, no éxon 2 de *HNF1α* em duas gerações da família analisada, resultante da transição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 339, na trinca que codifica o aminoácido 113 (TGG→TGA), levando a formação de uma proteína truncada. Estudos indicam que alterações ocorridas entre os aminoácidos 91-185 deste fator de transcrição seriam responsáveis pela ligação e especificidade na interação ao DNA e que a função normal da proteína *HNF1α* é necessária para a correta transcrição do gene da insulina. Assim, a descrição de uma nova mutação para diabetes tipo MODY3 relatada neste trabalho sugere importância funcional desta alteração genética no processo de secreção de insulina.

Estudos epidemiológicos indicam que aproximadamente 5% dos indivíduos classificados como portadores de diabetes mellitus tipo 2 e 10% daqueles considerados como tipo 1 sejam, na verdade, portadores de *Maturity-Onset Diabetes of the Young* (MODY), um subtipo de diabetes mellitus não-insulino dependente (NIDDM) (VELHO e FROGUEL, 1998). Esta forma monogênica de diabetes é caracterizada por apresentar manifestação precoce (antes dos 25 anos, geralmente), alta penetrância e modo de herança autossômica dominante (FROGUEL e VELHO, 1999; HATTERSLEY, 1998).

Seis genes MODY já foram identificados: fator hepatocítico nuclear-4 alfa, *HNF4α* (MODY 1) (YAMAGATA et al., 1996b); glicoquinase, *GCK* (MODY 2) (FROGUEL et al., 1992); fator hepatocítico nuclear-1 alfa, *HNF1α* (MODY 3) (YAMAGATA et al., 1996a); fator-1 promotor de insulina, *IPF1* (MODY 4)

(STOFFERS et al., 1997); fator hepatocítico nuclear-1 beta, *HNF1 β* (MODY 5); (HORIKAWA et al., 1997); e, *Neuro-D1/ β 2* (MODY 6) (MALECKI et al., 1999).

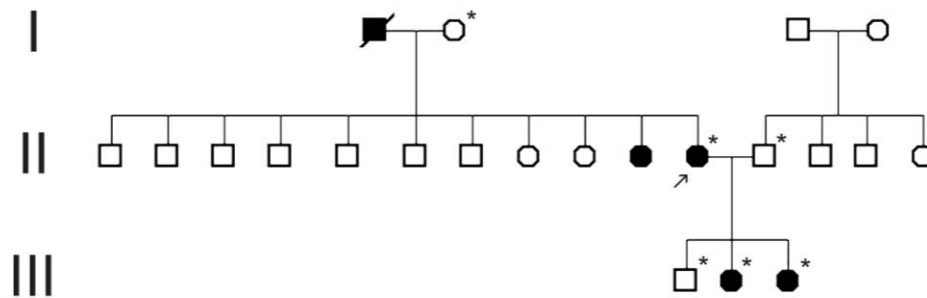
O MODY3, decorrente de mutações no gene *HNF1 α* , é o mais comum dos tipos mendelianos de diabetes e é encontrado em mais de 60% dos casos relatados de MODY, totalizando 1-2% dos indivíduos que apresentam diabetes (MURPHY et al., 2008). O fenótipo diabético dos portadores destas mutações deve-se à expressão gênica alterada nas células β -pancreáticas, principalmente dos genes que codificam a insulina, o transportador de glicose Glut2, transportadores de aminoácidos e enzimas mitocondriais (EMENS et al., 1992; SHIH et al., 2001).

Formas de diabetes monogênicas devem ser investigadas em pacientes jovens suspeitos de portarem DM1 ou DM2, com pais afetados, e que apresentam ausência de autoanticorpos contra antígenos pancreáticos, níveis circulantes moderados de peptídeo-C, não-obesidade, além da ausência de resistência à insulina (MURPHY et al., 2008). A identificação dos genes MODY tem implicações clínicas importantes para os pacientes e seu correto diagnóstico é essencial para um tratamento mais adequado da doença. O objetivo deste estudo foi examinar uma família suspeita de portar diabetes tipo MODY3, buscando a identificação de possíveis mutações presente no gene envolvido nesta síndrome e a sua correlação com os aspectos clínicos dos pacientes.

Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP autorização n. 14/2009, protocolo n. 00884/09). Três gerações de uma família da região sul do Brasil (Figura 1) com histórico de diabetes progressiva e precoce, características de MODY3 (FROGUEL e VELHO, 1999; HATTERSLEY, 1998; ISOMAA et al., 1998; MURPHY et al., 2008) foram analisadas, sendo que a probanda já manifestava indícios de quadros de hiperglicemia aos 16 anos e, suas filhas, aos 13 e 6 anos de idade.

Amostras de sangue venoso foram coletadas dos pacientes, anticoagulados com EDTA e o DNA genômico isolado (REGITANO, 2001) foi utilizado como molde em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Pelo fato do MODY3 ser a forma mais recorrente da doença no Brasil (MARASCHIN et al., 2008), foram sintetizados oligonucleotídeos para as regiões flangeadoras (íntrons) dos 10 éxons de *HNF1 α* . As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, purificadas e submetidas a sequenciamento nucleotídico (sequenciador automático ABI-PRISM 3100 - *Applied Biosystems*).

FIGURA 1: HEREDOGRAMA REPRESENTANDO MEMBROS DAS TRÊS GERAÇÕES DA FAMÍLIA ANALISADA NESTE ESTUDO



A seta indica a probanda e os asteriscos (*) representam os membros analisados no trabalho.

Após alinhamentos nucleotídicos, foi detectada a presença de uma mutação no éxon 2 do gene *HNF1α* em duas gerações da família analisada: a probanda e suas filhas. A transição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 339 do códon 113 (TGG→TGA) gerou uma mutação *nonsense* nesta posição (W113X), ainda não descrita na literatura, o que impossibilita a formação de uma proteína funcional nos indivíduos afetados. Já foram descritas mais de 300 diferentes mutações distribuídas ao longo de todo o gene *HNF1α* e região promotora (EIDE et al., 2008), sendo que a maioria das mutações na proteína HNF1α levam a formação de heterodímeros não-funcionais com o produto do alelo *HNF1α* normal, impedindo sua ligação ao DNA.

Todos os membros afetados apresentaram quadros de hiperglicemia em idades jovens e a probanda, atualmente com 38 anos, manifesta visão e micro-circulação comprometidos, características de uma síndrome progressiva, como MODY3. A idade do diagnóstico do MODY3 é determinada em parte pela localização da mutação, sendo que os pacientes onde as mutações se localizam entre os éxons 1-6 apresentam sintomas, em média, 8 anos antes do que aqueles com mutações nos éxons terminais (8-10) (HARRIES et al., 2006), fato que poderia explicar a precocidade da manifestação da doença nos indivíduos deste estudo.

Funcionalmente, a proteína HNF1α pode ser dividida em três regiões: domínio de dimerização amino-terminal (aminoácidos 1-32), domínio de ligação homeodomínio (203-276) e domínio de transativação amino-terminal (281-631) (MENDEL e CRABTREE, 1991). Estudos indicam que as taxas de mutação nesta proteína são mais

frequentes nas regiões de homeodomínios e em uma região amino-terminal próxima (POU_S), entre os resíduos 91-185 (CHI et al., 2002; RYFFEL, 2001), corroborando com os nossos achados (mutação no aminoácido 113). A região delimitada pelos aminoácidos 91 a 185 não possui homologia em sequência com outros fatores de transcrição, contudo é a responsável pela ligação e especificidade na interação ao DNA (CHI et al., 2002; TOMEI et al., 1992).

Pacientes com mutações em alguns dos domínios da proteína levam a quantidades diminuídas de HNF1 α funcionais ou por haploinsuficiência ou por um mecanismo dominante-negativo (WANG et al., 1998). Hagenfeldt-Johansson e colaboradores (2001), utilizando como modelos ratos transgênicos, sugeriram que a supressão da função do HNF1 α afeta a o metabolismo das células β após entrada pelo transportador de glicose, sendo a disfunção destas células a causa primária do MODY3. Wang e colaboradores (2000) a partir de um modelo de célula β (*rat insulinoma INS-1 cells*) expressando o mutante induzível HNF1 α -P291fsinsC (mutação mais comum identificada nas famílias MODY3 já estudadas), concluíram que a função normal da proteína HNF1 α é fundamental para a transcrição do gene da insulina.

A identificação correta de uma mutação gênica deste tipo leva a um diagnóstico adequado do paciente diabético, o qual dá subsídios para um prognóstico e tratamentos mais apropriados ao mesmo, visto que este tipo de síndrome leva a uma deterioração progressiva das células β -pancreáticas. Uma vez estabelecida a diabetes, a secreção de insulina se reduz com o tempo, resultando em um aumento na hiperglicemia e risco aumentado de complicações microvasculares, levando a necessidade de terapia farmacológica (OWEN e HATTERSLEY, 2001).

Em conclusão, os dados aqui apresentados descrevem uma nova mutação para diabetes tipo MODY3 e sugere importância funcional para esta alteração genética no processo de secreção de insulina, além de ressaltar a importância diagnóstica desta modalidade de diabetes visando o controle e acompanhamento clínico.

Referências

As referências deste capítulo estão reunidas no final deste trabalho.

3. CAPÍTULO 2

Variantes do gene *HNF1 α* : uma abordagem molecular em pacientes diabéticos da região dos Campos Gerais, Paraná.

Resumo

O diabetes tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) acomete uma parcela importante da população diabética (1 a 5%) e seu correto diagnóstico pode ser determinante para o tratamento clínico. Tendo em vista a extensa variação molecular já detectada em diferentes genes relacionados ao MODY, foi objeto do presente estudo realizar o sequenciamento nucleotídico dos 10 éxons do gene do Fator Hepatocítico Nuclear 1 α (*HNF1 α*) em oito pacientes diabéticos, suspeitos de MODY, da região dos municípios dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. Dos pacientes amostrados, sete deles apresentaram variações para o gene *HNF1 α* : sete mutações silenciosas já descritas, e as variantes I27L, A98V e S487N, descritos em pacientes com a forma comum do diabetes tipo 2 e em pacientes não diabéticos.

Introdução

A classificação do diabetes mellitus tem sofrido diversas modificações ao longo do tempo. Inicialmente subdividida de acordo com a idade de aparecimento (diabetes juvenil ou tardia), posteriormente refletindo as necessidades terapêuticas do paciente (diabetes mellitus insulino-dependente, diabetes mellitus não-insulino-dependente) e a corrente classificação, que data de 1999 e reflete a etiologia e a patogênese da doença (WHO, 1999; WHO/IDF, 2006; ADA, 2006). Ela inclui dois principais grupos (diabetes mellitus tipo 1 e diabetes mellitus tipo 2), além da diabetes gestacional e um grupo denominado “outros tipos de diabetes” (ADA, 2009). Este último inclui defeitos genéticos que afetam a função das células β -pancreáticas, como é o caso do diabetes tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young* -MIM 606391), o qual compreende entre 1 a 5% de todos os casos de diabetes (BEIJERS et al., 2009).

Embora possam existir casos onde as características se sobrepõem entre diabetes tipo 1 e tipo 2, dificultando o correto enquadramento do paciente a partir do fenótipo, o diabetes tipo MODY é caracterizado por herança monogênica autossômica dominante,

aparecimento precoce (geralmente antes dos 25 anos de idade) com ao menos um e idealmente dois familiares afetados e disfunção das células β -pancreáticas (TATTERSALL, 1974 ; HATTERSELEY, 1998).

Até o presente, são amplamente aceitos seis subtipos de MODY, relacionados a mutações em seis diferentes genes, mas a lista tem crescido para nove (NYUNT et al., 2009) e acredita-se na existência de vários outros, ainda não identificados, denominados de MODY “X” (CHÈVRE et al., 1998). O MODY2 (MIM 125851) e o MODY3 (MIM 600496), relacionados a mutações nos genes *GCK* e *HNF1 α* , respectivamente, são os subtipos mais comuns em todas as populações já estudadas, com as frequências variando de acordo com a população. No Brasil, a prevalência para o MODY3 é de 13% - 46,2%, seguido pelo MODY2, com 7,7% - 12,5% (MOISES et al., 2001; FURUZAWA et al., 2008; MARASCHIN et al., 2008).

Um aspecto de crescente interesse que vem emergindo nos últimos anos são variantes genéticas que não explicam, isoladamente, a doença, mas que representam um indício de risco leve a moderado de desenvolver diabetes tipo 2 em alguns casos (SLADEK et al., 2007; SCOTT et al., 2007; ZEGGINI et al., 2008, STAIGER et al., 2009) ou de diabetes atípica em outros (MAUVAIS-JARVIS, 2003; BOUTIN et al., 1999). Dessa maneira, o diagnóstico preciso de MODY pode ser determinante na conduta clínica em casos de diabetes menos severa como no MODY2 (não progressivo e com baixa prevalência de complicações microvasculares), mas principalmente em situações de maiores agravos como no caso do MODY3. Neste último, a hiperglicemia é significativa e o estado progressivo da doença merece controle metabólico rigoroso e prevenção a complicações crônicas (FRAYLING et al., 1997; OWEN e HATTERSLEY, 2001).

Para testar a presença de mutações relacionadas ao gene *HNF1 α* , foi proposto no presente trabalho a amplificação e sequenciamento nucleotídico dos 10 éxons deste gene, visando a detecção de mutações gênicas em pacientes suspeitos de portarem diabetes MODY3, provenientes da região dos municípios da região dos Campos Gerais do Paraná, no sul do Brasil.

Pacientes e Métodos

Este estudo reuniu oito pacientes não aparentados que apresentavam difícil controle medicamentoso do diabetes, com características clínicas clássicas de MODY

(três gerações afetadas, surgimento precoce em ao menos um indivíduo da família e características autossômicas dominantes) (TATTERSALL, 1974) e suspeita de MODY3 (disfunção das células β levando a um quadro severo de evolução rápida com hiperglicemia elevada e progressiva) (FRAYLING et al., 1997; OWEN e HATTERSLEY, 2001). Os pacientes foram recrutados a partir do Instituto de Pesquisa Aplicada em Medicina (INSPAN) com indicação endocrinológica. De cada paciente, foram colhidos dados clínicos e laboratoriais.

Esta pesquisa recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP-UEPG, Protocolo de Pesquisa n° 00884/09, parecer número 14/2009) e obteve o consentimento informado por escrito dos pacientes, cientes dos objetivos do estudo, através do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue através de uma adaptação ao método padrão de digestão enzimática com proteinase K, segundo REGITANO (2001). Para amplificação dos éxons do gene *HNF1 α* , foram preparadas reações utilizando 40ng de DNA molde, tampão de reação 1 X (contendo 200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 U de enzima DNA polimerase (Taq DNA Polimerase Invitrogen®), 20 μ M de cada *primer* (*sense* e *antisense*), 1.5 mM MgCl₂, 0.08 mM de cada dNTP (Invitrogen). A reação de amplificação dos segmentos gênicos (reação em cadeia da polimerase, PCR) foi realizada em termociclador (Biocycler®) e consistiu de 35 ciclos dos passos de desnaturação (1min a 95°C) seguido de anelamento (45seg a 63°C) e polimerização nucleotídica (1min a 72°C). Os *primers* utilizados nas reações de PCR e sequenciamento foram desenhados a partir da sequência do gene *HNF1 α* depositada no *GenBank*, com auxílio do *software* Oligo Analyzer 3.0 (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/).

As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose, purificadas e submetidas a sequenciamento nucleotídico utilizando sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer com capilares POP6 (POP-6™ polymer – Applied Biosystems). Para as reações de sequenciamento foram utilizados aproximadamente 60 ng de DNA, 4,5 pmol de *primer* (*sense* e *antisense*) e água ultra pura para completar 6 μ L. Os resultados obtidos foram analisados com os programas CLC Sequence Viewer 6 (©CLC bio, Aarhus, Dinamarca) e 4Peaks 1.7 (©Mekentosj, Amsterdam, Holanda). Para alinhamento e comparação de homologia das sequências, foi utilizada a sequência de referência do gene *HNF1 α* , obtida a partir da plataforma

Consensus Coding Sequence Database – NCBI (National Center for Biotechnology Information), entrada CCDS9209.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Resultados

Os dados clínicos e laboratoriais dos 8 pacientes (letras A a H) deste estudo estão reunidos nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1. DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO

Pacientes Dados	A	B	C	D	E	F	G	H
Idade atual	60	50	40	48	81	39	48	60
Agregação familiar de diabetes ¹	3 (1°)	1 (1°)	*	1 (1°)	*	4 (1°)	*	4 (1°)
Idade de diagnóstico do diabetes (anos)	*	36	26	38	*	16	40	45
IMC	28,37	30,30	26,47	33,57	*	*	28,58	31,94
Hipertensão arterial ²	sim	Sim	não	não	*	sim	não	sim
Tratamento atual para o diabetes ³	insulina	insulina	insulina	agentes orais	*	insulina	agentes orais	insulina e agentes orais
Complicações microvasculares	sim	Não	não	não	*	sim	não	sim
Complicações macrovasculares	sim	Não	não	não	*	sim	sim	*

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes selecionados para o estudo

¹Número de parentes afetados, grau de parentesco entre parênteses.

²Pressão sanguínea maior ou igual a 130/80 mmHg em ao menos duas aferições ou necessidade de medicamento anti-hipertensivo

³Incluindo: dieta e/ou exercícios e/ou agentes orais e/ou insulino-terapia

IMC: Índice de massa corporal = peso/(altura)² (valor de referência: entre 18.5 e 25).

TABELA 2. DADOS LABORATORIAIS DOS PACIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO

Pacientes	A	B	C	D	E	F	G	H
Dados								
HDL	41mg/dL	35mg/dL	*	49mg/dL	*	*	43,8mg/dL	*
Triglicerídeos	88mg/dl	495mg/dl	545mg/dl	325mg/dl	*	198mg/dl	190mg/dl	*
Hb1Ac	6,4%	14,3%	9,78%	10,68%	*	11,3%	11,45%	*
Glicemia pós prandial	186mg/dL	*	332mg/dL	*	*	*	326mg/dL	324mg/dL
Glicemia de jejum	165mg/dL	*	406mg/dL	278mg/dL	*	*	305mg/dL	*
Peptídeo C	2,50ng/mL	3,37ng/mL	1,4ng/mL	3,5ng/mL	*	1,20ng/mL	2,1ng/mL	1,2ng/mL
Insulina basal	5uUI/mL	11,3uUI/mL	*	13,8uUI/mL	*	28,30uUI/mL	9,10uUI/mL	*
Insulina pos prandial	17 uUI/mL	45,6	*	*	*	*	*	*
Anti-GAD	0,5U/mL	0,5U/mL	0,2U/mL	0,2U/mL	*	0,1U/mL	0,5U/mL	*
Anti-ilhotas de langerhans	não reagente	*	0,8	não reagente	*	0,2	0,5	*
Anticorpo anti-insulina	1U/mL	*	0,8U/mL	1,6U/mL	*	*	0,61U/mL	*

Valores de referência: HDL: ≥ 60 mg/dL; Triglicerídeos: até 200 mg/dl (desejável); Hb1Ac: 4,0 a 7,0%; Glicemia pós prandial: até 140mg/dL ; Glicemia de jejum: 60 – 99mg/dL; peptídeos C: 1,1 a 5,0 ng/mL ; Insulina basal: até 29,1 μ UI/mL; insulina pós prandial: inferior a 150,0 μ UI/mL; anti-GAD: até 1,0 U/mL; Anti-ilhotas de Langerhans: não reagente; anti-insulina: até 1 U/mL.

* Dados não disponíveis.

Quanto a análise molecular, foram encontradas, no total, nove variações no gene *HNF1 α* : 6 mutações sinônimas e 3 mutações de sentido trocado. Todas as variantes encontradas estão sumarizadas na tabela 3.

Dos oito pacientes selecionados para o estudo, apenas o paciente D (12,5%) não apresentou alterações nas sequências analisadas do gene *HNF1 α* enquanto os outros sete pacientes (87,5%) apresentaram mutações já descritas na literatura. Mutações silenciosas do tipo A15A, L17L, Q141Q, G288G, L459L, T515T (resultantes da troca nucleotídica CTC \rightarrow CTG, GCC \rightarrow GCA, CAG \rightarrow CAA, GGG \rightarrow GGC, CTG \rightarrow CTC, ACG \rightarrow ACA, respectivamente) foram evidenciadas em três pacientes, C, G e H (37,5%), ao passo que para outros quatro pacientes, A, B, E e F (50%), foi identificada ao menos uma mutação sinônima e uma mutação de sentido trocado ao mesmo tempo (mutação *missense*). Especificamente, as mutações *missense* I27L (ATC \rightarrow CTC) e

A98V (GCC→GTC) foram encontrados em um mesmo paciente (A). O polimorfismo I27L foi encontrado em três pacientes (A, B e F) e, S487N (AGC→AAC) em apenas um paciente (E).

TABELA 3. VARIAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE *HNF1α* DOS PACIENTES SELECIONADOS

Indivíduos	Localização	Códon	Troca nucleotídica	Designação
F	Éxon 1	15	CTC(Arg)→CTG(Arg)	A15A
A, B, F, H	Éxon 1	17	GCC(Leu)→GCA(Leu)	L17L
A, B, F	Éxon 1	27	ATC(Ile)→CTC(Leu)	I27L
A	Éxon 1	98	GCC(Ala)→GTC(Val)	A98V
E, G	Exón 2	141	CAG(Gln)→CAA(Gln)	Q141Q
B, C, E, F	Exón 4	288	GGG(Gly)→GGC(Gly)	G288G
E	Exón 7	459	CTG(Leu)→CTC(Leu)	L459L
E	Exón 7	487	AGC(Ser)→AAC(Asn)	S487N
B	Exón 8	515	ACG(Thr)→ACA(Thr)	T515T

Tabela 3. Variações encontradas no gene *HNF1α* dos pacientes selecionados. Destaque em negrito indica variações não sinônimas.

Discussão

Já foram descritas mais de 300 diferentes mutações distribuídas ao longo de todo o gene *HNF1α* e região promotora (EIDE et al., 2008). Tradicionalmente, mutações sinônimas são classificadas como polimorfismos alélicos e geralmente descartadas em análises de maior interesse por serem consideradas neutras. Contudo, é preciso ter certos cuidados antes de preassumir essa neutralidade. Se a interpretação destas mutações não for baseada na caracterização do RNAm, pode estar incorreta. Mutações silenciosas que afetem sequências importantes para a modulação do *splicing* são susceptíveis a ter um efeito profundo sobre o produto a ser traduzido. Cartegni e colaboradores (2002) reuniram mais de 20 estudos que relatavam mutações sinônimas de ponto específicas dentro de regiões codificadoras associadas a alterações no *splicing* que consequentemente conduziam a exclusão de algum éxon. Mutações localizadas em

“promotores” (*enhancers*) ou “silenciadores” de *splicing* também podem afetar o *splicing* correto (ELLARD et al., 2008). No presente trabalho, nenhuma das 6 variações sinônimas encontradas nos éxons do gene *HNF1a* pertenciam a sítios doadores de *splicing* conhecidos.

A proteína HNF1 α consta essencialmente de três domínios funcionais: domínio de dimerização (N-terminal), o domínio de ligação ao DNA (com um motivo POU_S e uma região homeodomínio POU_H) e o domínio de transativação (C-terminal) (figura 1) (RYFFEL et al., 2001). Uma evidência indireta da importância de determinado aminoácido em determinada posição é dada por sua conservação entre as espécies. As sequências de HNF1 α são completamente conservadas em humanos, ratos, hamsters e camundongos para os 37 primeiros aminoácidos (que se estendem para além do domínio N-terminal); os demais domínios exibem alto grau de conservação entre humanos, ratos e camundongos, denotando maior divergência em relação aos aminoácidos 38, 39, 41, 42, 53, 58, 67, 69, 73, 82 e 89 (CHIU et al., 2003). Os polimorfismos encontrados neste trabalho estão contidos no domínio de dimerização da proteína (I27L), no domínio POU_S de ligação ao DNA (A98V) e no domínio de transativação (S487N), regiões com alto grau de conservação entre espécies..

Figura 1. Representação da estrutura da proteína HNF1 α .

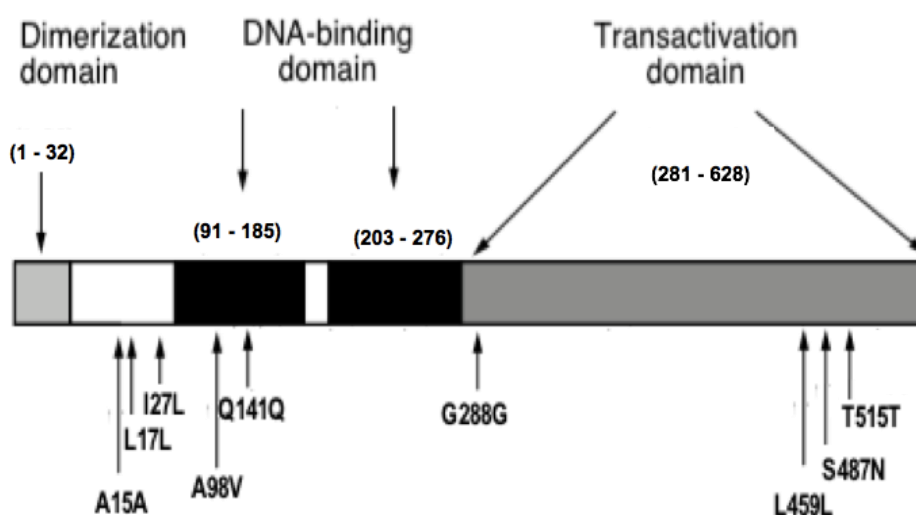


Figura 1. Representação da estrutura da proteína HNF1 α . Os domínios funcionais estão indicados pelas setas do lado superior da figura e o número dos resíduos aminoácidos entre parênteses. A posição relativa das mutações encontradas está indicada pelas setas inferiores. Adaptado de CHÈVRE et al., 1998

Chiu e colaboradores (2003), investigando o impacto de I27L na resposta insulínica ao teste oral de tolerância a glicose, encontraram risco modesto para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2), enquanto Chen e colaboradores (2010) encontraram risco aumentado em desenvolver DM 2 em indivíduos orientais (chineses e japoneses). Holmkvist e colaboradores (2006) estudaram a atividade dos variantes I27L, A98V e S487N em ensaios *in vitro* (células HeLa e INS-1) e *in vivo* (em pacientes escandinavos) e encontraram redução da atividade transcricional (*in vitro*). *In vivo*, foi verificada significativa e progressiva diminuição da secreção de insulina perante ingestão de glicose, principalmente no que diz respeito a portadores do alelo V no polimorfismo A98V. I27L estava associado também com risco aumentado de DM2, particularmente em indivíduos acima de 60 anos e com sobrepeso (IMC>25kg/m²), caso dos indivíduos A, B e F do nosso estudo, que são também hipertensos e dois deles (A e F) apresentam complicações micro e macrovasculares, evidenciando um quadro clínico mais severo.

O variante A98V está contido no domínio de ligação ao DNA e consiste na troca do resíduo Alanina por Valina (ambos apolares). Este aminoácido é conservado em humanos, ratos, camundongos e galinha (HORLEIN et al., 1993). Urhammer e colaboradores (1997, 1998), em estudos conduzidos na Dinamarca sobre a relação entre DM2 e o variante A98V, encontraram redução de 20% na liberação de insulina mediante Teste Oral de Tolerância a Glicose em indivíduos caucasianos. Outro estudo com a população escandinava sugeriu associação deste polimorfismo com aparecimento precoce de DM2 (DM2) (LEHTO et al., 1999). Rissanen e colaboradores (2000) encontraram associação entre A98V com DM2 tardia (*late onset*) em Finlandeses, mas não em Chineses. Alterações não foram encontradas para os polimorfismos I27L e S487N. Wincler e colaboradores (2005) verificaram uma fraca associação com o polimorfismo A98V para a patogênese do DM2 em pacientes caucasianos provenientes da Suécia, Finlândia e Canadá e ausência de associação para I27L. Anuradha e colaboradores (2005) encontraram relação entre A98V, diabetes tipo MODY e o aparecimento precoce de diabetes em indivíduos indianos asiáticos portadores de DM2. Corroborando este último trabalho, Sahu e colaboradores (2007) verificaram uma associação significativa entre A98V e o desenvolvimento precoce de DM2 em uma população do norte da Índia, enquanto Shekher e colaboradores (2007) observaram a mesma relação em outra população mais ao sul da Índia.

Numa amostra de pacientes brasileiros com diabetes mellitus autossômica dominante de início tardio, Giuffrida e colaboradores (2009) descrevem frequência aumentada do polimorfismo A98V.

O variante S487N (substituição de uma Serina por Aspargina, ambos resíduos polares) (paciente E) foi relatado previamente por Lee e colaboradores (2001), num estudo realizado na Coreia. Os autores não encontraram correlação deste variante na patogênese de MODY3 ou DM2. Contudo, num estudo recente em uma amostra de pacientes brasileiros com DM2 autossômico dominante de início tardio, Giuffrida e colaboradores (2009) evidenciaram maior prevalência do variante S487N entre os pacientes.

Apesar de estudos mostrarem relação entre determinados polimorfismos com o diabetes, a presença de variantes em pacientes normoglicêmicos sugere que o alelo mutante, exclusivamente, é improvável de causar diabetes. Fatores como obesidade e resistência a insulina devem ser necessários para desencadear sua expressão, como citado por Hegele e colaboradores (1999) e estudos mais específicos sobre cada variação podem auxiliar a esclarecer suas implicações para o desenvolvimento do diabetes. Os resultados contraditórios entre alguns destes estudos pode ser explicado em parte por características étnicas da população estudada ou também em virtude da escolha do grupo amostral.

Não foi possível atribuir o diabetes dos pacientes deste estudo como sendo causado por mutações MODY3. Essa ausência de relação entre clínica e testes genéticos também foi encontrada por Johansen e colaboradores (2005), e Furuzawa e colaboradores (2008). Contudo, a presença marcante de polimorfismos (quatro de oito pacientes) já associados ao DM2, mas contidos no gene responsável pelo MODY3, permite levantar questões quanto ao enquadramento destes pacientes como diabéticos tipo 2 e inferir uma forma menos evidente de MODY3. O fato de os pacientes apresentarem sobrepeso pode ser indicativo de uma relação mais complexa entre o desenvolvimento de obesidade com os polimorfismos encontrados e a patogênese de diabetes, especialmente para o paciente A, que portava simultaneamente dois variantes (I27L e A98V), e apresenta já aos 41 anos de idade hipertensão, sobrepeso e complicações micro e macrovasculares. A expressão ou não do fenótipo diabético em portadores destes polimorfismos se explicaria por diferenças epigenéticas.

Finalmente, algum outro tipo de MODY que não o 3 também pode ser inferido, além de mutações na região promotora de *HNF1 α* e em sítios intrônicos de *splicing* (não analisados).

Em conclusão, foram encontrados no presente estudo variações em sequências exônicas para o gene *HNF1 α* nos pacientes amostrados sendo estas sete mutações silenciosas já descritas na literatura das quais os variantes I27L, A98V e S487N, já foram descritos em pacientes com a forma comum do DM2. Outros estudos reportam que estes variantes adicionalmente foram encontrados em pacientes não diabéticos, refletindo em controversa significância destes polimorfismos.

Referências

As referências desde capítulo encontram-se reunidas ao final deste trabalho.

4. DISCUSSÃO

De acordo com Harries e colaboradores (2006) pacientes onde as mutações se localizam entre os éxons 1-6 apresentam sintomas, em média, 8 anos antes do que aqueles com mutações nos éxons terminais (8-10) e Bellanné-Chantelot e colaboradores (2008) encontraram que a idade de diagnóstico do diabetes é menor em pacientes com mutações que causam truncagem do que mutações de sentido trocado. Estes dados estão de acordo com nosso achado de uma nova mutação, no gene *HNF1α*, ainda não descrita na literatura, que estava presente em três indivíduos diabéticos de início precoce de uma mesma família (Capítulo 1). Em tal trabalho, a probanda e duas filhas também afetadas apresentaram diabetes aos 16, 13 e 6 anos, respectivamente, e a mutação presente no éxon 2 do gene *HNF1α*, é do tipo truncante (*nonsense*), causando o término precoce da cadeia polipeptídica.

A mutação encontrada nesta família, a qual produz um códon de parada provocando final precoce da tradução de *HNF1α*, está contida no segundo éxon deste gene, concordando também com Ellard e Colclough (2006), que relatam alta frequência de mutações no gene *HNF1α* concentradas nos éxons 2 e 4.

Frente a uma parada tão precoce na tradução, a proteína resultante é provavelmente biologicamente não funcional por não possuir os domínios de ligação ao DNA e de transativação. Estes achados condizem com a severidade do diabetes nestes pacientes aqui estudados, que segundo Frayling e colaboradores (1997), apresentam hiperglicemia progressiva grave e com frequência desenvolvem complicações microvasculares (OWEN e HATTERSLEY, 2001), refletindo a importância do *HNF1α* para o bom controle glicêmico, principalmente no que tange ao funcionamento normal das células β .

Além disso, o presente estudo permitiu a identificação de 9 polimorfismos em 8 indivíduos não aparentados (Capítulo 2): 5 variantes sinônimos e 3 mutações de sentido trocado, todos previamente descritos na literatura. Embora nestes pacientes só tenham sido evidenciados polimorfismos em *HNF1α*, sua presença frequente em pacientes com DM2 permite questionar sobre qual a correta designação de diabetes nestes pacientes, se DM2 ou MODY3. O primeiro (I27L) está contido no domínio de dimerização da proteína *HNF1α*, uma região completamente conservada em humanos, ratos, hamsters e camundongos (CHIU et al., 2003) que é importante para a correta dimerização e ligação da proteína com o DNA (RYFFEL, 2001); A98V está contido no

domínio POU₅ e mutações nesta região são conhecidas por conduzir ao MODY3 principalmente por afetarem a ligação de HNF1 α ao DNA, interferindo na estabilidade protéica ou na localização nuclear (CHI et al., 2002).

5. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu a identificação de uma nova mutação no gene *HNF1 α* causadora de MODY3, encontrada em três pacientes diabéticos de uma mesma família, correspondendo a duas gerações (mãe e duas filhas) e paralelamente, a identificação de quatro pacientes portando quatro diferentes mutações *missense* que correspondem a polimorfismos já descritos na literatura e que estão implicados na patogênese do diabetes, especialmente DM2. A relação de polimorfismos com o diabetes é bom foco para investigações, especialmente para I27L, que encontra-se numa região bastante conservada de *HNF1 α* e de A98V, localizado no domínio POU₅, importante para a dimerização e ligação ao DNA. Além disso, a abordagem e conduta clínica destes pacientes merece ser rediscutida, haja vista a designação paradoxal de DM2 para pacientes com polimorfismos no gene causador de diabetes tipo MODY3.

A mutação W113X encontrada causando diabetes em uma família de nossa amostra provavelmente induz ao diabetes por haploinsuficiência já que estes indivíduos, heterozigotos para esta mutação, possuem um alelo normal conduzindo a proteína *HNF1 α* completa de 631 aminoácidos e um alelo mutante, que gera um peptídeo de apenas 113 aminoácidos. Este peptídeo não possui as regiões de homeodomínio responsáveis pela ligação ao DNA e a região responsável pela ativação da transcrição (domínio de transativação), sendo, portanto, não funcional.

O diagnóstico de MODY3 para os pacientes para os quais não foram encontradas mutações nos éxons do *HNF1 α* deve ser investigado para a região promotora do gene, visto que trabalhos relatam possíveis mutações nestas regiões, bem como nos sítios intrônicos de *splicing*. Cabe destacar que estes pacientes em específico, possuem sobreposição de quadro clínico diabético, mau controle metabólico e presença de agregação familiar, indicativos de diabetes tipo MODY.

6. REFERÊNCIAS

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes–2006. *Diabetes Care*. Vol. 29, Sup 1. 2006.

____. Standards of medical care in diabetes 2009. *Diabetes Care*. Supl. 1. 2009.

ALBERTS, B., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. 2002.

ANURADHA, S., et al. A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 (Ala98Val) of the hepatocyte nuclear factor-1alpha is associated with maturity-onset diabetes of the young and younger age at onset of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care*. Vol. 28. 2005.

APPLETON, M., et al. Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor-1a Gene are a Common Cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young in the U.K. *Diabetes*. Vol. 46, N.4.1997.

BACH, I., et al. Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localkization of its gene in man and mouse. *Genomics*. Vol. 8, N. 1. 1990.

BACH, I.; YANIV, M. More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *The EMBO journal*. Vol. 12. 1993.

BEIJERS, H. J. B. H., et al. Hepatocyte nuclear factor (HNF)1A and HNF4A substitution occurring simultaneously in a family with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetic Medicine*. Vol 26, N. 11. 2009.

BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature*. Vol. 414. 2001.

BELLANNÉ-CHANTELOT, C., et al. Mutations in the ELA2 gene correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. *Blood*. Vol 103, N. 11. 2004.

_____, et al. The Type and the Position of HNF1A Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)-3. *Diabetes*. Vol. 57. 2008.

BOJ, S. F., et al. A Transcription Factor Regulatory Circuit in Differentiated Pancreatic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 98. 2001.

BOUTIN, P., et al. Missense mutation Gly574 Ser in the transcription factor HNF-1 alpha is a marker of atypical diabetes mellitus in African-American children. *Diabetologia*. Vol. 42. 1999.

CARTEGNI, L., et al. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* Vol. 3. 2002.

CARTER, J. S., et al. Non-insulin-dependent diabetes mellitus in minorities in the United States. *Ann Intern Med.* Vol. 125, N. 3. 1996.

CHEN, T., et al. I27L Polymorphism in hepatocyte nuclear factor-1 α gene and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of studies about orient population (Chinese and Japanese). *International Journal of Diabetes Mellitus.* Vol. 2, N. 1. 2010.

CHÈVRE, J. C. et al. Mutation Screening in 18 Caucasian Families Suggest the Existence of other MODY Genes. *Diabetologia.* Vol. 41, N. 9.1998.

CHI, Y. et al. Diabetes Mutations Delineate an Atypical POU Domain in *HNF-1 α* . *Molecular Cell.* Vol. 10. 2002.

CHIU, K. C., et al. Comparison of the impact of the I27L polymorphism of the hepatocyte nuclear factor-1 α on estimated and measured beta cell indices. *European Journal of Endocrinology.* Vol. 148. 2003.

COLLET, C., et al. Prevalence of the missense mutation Gly574Ser in the hepatocyte nuclear factor-1 α in Africans with diabetes. *Diabetes Metab.* Vol. 28. 2002.

COURTOIS, G. et al. Interaction of a Liver-Specific Nuclear Factor with the Fibrinogen and Alpha-1-Antitrypsin Promoters. *Science.* Vol. 238. 1987.

DEAN, L. et al. The Genetic Landscape of Diabetes. NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=diabetes.TOC&depth=1>>. 2004.

DEFRONZO, R. A. The Triumvirate: Beta-cell, Muscle, Liver. A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes.* Vol. 37, N. 6.1988.

EIDE, S. A. et al. Prevalence of HNF1A (MODY3) Mutations in a Norwegian Population (the HUNT2 Study). *Diabetic Medicine.* Vol. 25. 2008.

EKOÉ, J. M., et al. The Clinical Syndrome and the Biochemical Definition in *The Epidemiology of Diabetes Mellitus.* 2 Ed. EKOÉ, J-M. (Ed) et al. John Wiley e Sons, Ltd.:Reino Unido. 2008.

ELBEIN, S. C., et al. Molecular scanning analysis of hepatocyte nuclear factor 1 α (*TCF1*) gene in typical familial type 2 diabetes in African Americans. *Metabolism.* Vol. 49. 2000.

ELLARD, S. A High Prevalence of Glucokinase Mutations in Gestational Diabetes Subjects Selected by Clinical Criteria. *Diabetologia.* Vol. 43. 2000.

_____, et al. Mutations in the Genes Encoding the Transcription Factors Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha (HNF1A) and 4 Alpha (HNF4A) in Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Human Mutation*. Vol. 27, N. 9. 2006.

EMENS, L. A., et al. Hepatocyte Nuclear Factor 1 α is Expressed in a Hamster Insulinoma Line and Transactivates the Rat Insulin I Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 89. 1992.

FAJANS, S. S., et al. Tolbutamide-induced Improvement in Carbohydrate Tolerance of Young People with Mild Diabetes Mellitus. *Diabetes*. Vol. 99. 1960.

_____. Revised Etiologic Classifications of Diabetes. *Diabetes Care*. Vol.21, N.3. 1998.

_____, et al. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *New England Journal of Medicine*. Vol. 345. 2001.

_____, et al. Phenotypic Heterogeneity Between Different Mutations of MODY Subtypes and Within MODY Pedigrees. *Diabetologia*. Vol. 49. 2006.

FARRELLY, A. M., et al. Early Loss of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signalling and Reduction in Cell Size During Dominant-Negative Suppression of Hepatic Nuclear Factor 1-Alpha (HNF1A) Function in INS-1 Insulinoma Cells. *Diabetologia*. Vol. 52. 2009.

FRAYLING. T. M., et al., 1997 apud VELHO, G, FROGUEL, P. Molecular Genetics of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Vol. 10, N. 4.1999.

_____, et al. B-cell Genes and Diabetes: Molecular and Clinical Characterization of Mutations in Transcription Factors. *Diabetes*. Vol. 50, Suppl.1. 2001.

FROGUEL, P. Familial Hyperglycemia due to Mutations in Glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 328, N. 10. 1993.

_____, et al. Close Linkage of Glucokinase Locus on Chromosome 7p to Early-Onset Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Nature*. Vol. 356. 1992.

_____, et al. Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Current Opinion in Pediatrics*. Vol. 6, N. 4. 1994.

_____, et al. Molecular Genetics of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Vol. 10, N. 4. 1999.

FURUZAWA, G. K., et al. Low prevalence of MODY2 and MODY3 mutations in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype. *Diabetes Res Clin Pract*. Vol. 81. 2008.

GAVIN, J. R., et al. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. Vol. 26, Suppl. 1. 2003.

GIDH-JAIN, M., et al. Glucokinase Mutations Associated With Non-insulin-dependent (type 2) Diabetes Mellitus have Decreased Enzymatic Activity: Implications for Structure/function Relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 90, N. 5. 1993.

GIUFFRIDA, F. M. A., et al. HNF1A Gene Polymorphisms and Cardiovascular Risk Factors in Individuals with Late-Onset Autosomal Dominant Diabetes: a Cross-Sectional Study. *Cardiovascular Diabetology*. Vol. 8. 2009.

HAGENFELDT-JOHANSSON, K. A., et al. β -Cell-Targeted Expression of a Dominant-Negative Hepatocyte Nuclear Factor-1 α Induces a Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)3-Like Phenotype in Transgenic Mice. *Endocrinology*. Vol. 142. 2001.

HARRIES, L. W., et al. Isomers of the TCF1 Gene Encoding Hepatocyte Nuclear Factor-1 Alpha Show Differential Expression in the Pancreas and Define the Relationship Between Mutation Position and Clinical Phenotype in Monogenic Diabetes. *Human Molecular Genetics*. Vol. 15. 2006.

HATTERSLEY, A. T. Maturity-Onset Diabetes of the Young: Clinical Heterogeneity Explained by Genetic Heterogeneity. *Diabetic Medicine*. Vol. 15. 1998.

_____. Diagnosis of maturity-onset diabetes of the young in the pediatric diabetes clinic. *Journal Pediatr Endocrinol Metabol*. Vol 13, suppl 6. 2000.

HEGELE, R. A. The Hepatic Nuclear Factor-1 α G319S Variant is Associated with Early-Onset Type 2 Diabetes in Canadian Oji-Cree. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 84, 1999.

HOLMKVIST, J., et al., Common variants in HNF-1 alpha and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*. Vol. 49. 2006

HORIKAWA, Y., et al. Mutation in Hepatocyte Nuclear Factor-1b Gene (TCF2) Associated With MODY. *Nature Genetics*. Vol. 17. 1997.

HORLEIN, A., et al. Genomic structure of the pou- related hepatic transcription factor HNF-1alpha. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. Vol. 374. 1993.

IDF. Diabetes Facts and Figures. *International Diabetes Federation* in <http://www.idf.org/>. 2009.

ISOMAA, B., et al. Chronic Diabetic Complications in Patients with MODY3 Diabetes. *Diabetologia*. Vol. 41. 1998.

JOHANSEN, A., et al. Half of clinically defined maturity onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in *HNF4A*, *GCK* and *TCF1*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol 90. N 8. 2005.

LEE, H. J., et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 α is not a common cause of MODY and early-onset type 2 diabetes in Korea. *Acta Diabetologica*. Vol. 38, N. 3. 2001.

LEHTO, M., et al. High Frequency of Mutations in MODY and Mitochondrial Genes in Scandinavian Patients with Familial Early-Onset Diabetes. *Diabetologia*. Vol. 42. 1999.

MALECKI, M. T., et al. Mutations in *NEUROD1* are Associated with the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Nature Genetics*. Vol. 23. 1999.

MARASCHIN, J., et al. HNF1 α Mutations are Present in Half of Clinically Defined MODY Patients in South-Brazilian Individuals. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. Vol. 52, N. 8. 2008.

MARASCHIN, J. F., et al. Classificação do diabetes mellito. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Vol. 95, N. 2. 2010.

MATSCHINSKY, F. M. A. Lesson in Metabolic Regulation Inspired by the Glucokinase Glucose Sensor Paradigm. *Diabetes*. Vol. 45. 1996.

_____. Regulation of Pancreatic Beta-cell Glucokinase: from Basics to Therapeutics. *Diabetes*. Vol. 51, N. 3. 2002.

MAUVAIS-JARVIS, F., et al. The polymorphism Gly574Ser in the transcription factor HNF-1 α is not a marker of adult-onset ketosis-prone atypical diabetes in Afro-Caribbean patients. *Diabetologia*. Vol. 46. 2003.

_____, et al. Ketosis-Prone Type 2 Diabetes in Patients of Sub-Saharan African Origin. *Diabetes*. Vol. 53. 2004.

MENDEL, D. B., et al. HNF-1, a Member of a Novel Class of Dimerizing Homeodomain Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 266, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Brasil 2009: uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde. *Brasília/DF*. 2010.

MOISES, R. S., et al. Prevalence of maturity-onset diabetes of the young mutations in Brazilian families with autosomal-dominant early-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care*. Vol. 24. 2001.

MORRAN, M. P., et al. Immunology and genetics of type 1 diabetes. *Mt Sinai J Med*. Vol. 75, N. 4. 2008.

MURPHY, R., et al. Clinical Implications of a Molecular Genetic Classification of Monogenic Beta-cell Diabetes. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. Vol. 4. 2008.

NATHAN, D. M., et al. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. Vol. 32, N. 7. 2009.

NAVALÓN-GARCIA, K., et al. *HNF-1α* G574S is a functional variant with decreased transactivation activity. *Diabetic Medicine*. Vol. 23, N 12. 2006.

NJOLSTAD, P. R., et al. Permanent Neonatal Diabetes Caused by Glucokinase Deficiency: Inborn Error of the Glucose-insulin Signaling Pathway. *Diabetes*. Vol. 52. 2003.

NYUNT, O., et al. Investigating Maturity Onset Diabetes of the Young. *Clinical Biochemistry Reviews*. Vol. 30. 2009.

ODOM, D.T., et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*. New York, NY. Vol. 303. 2004.

OLEK, K. Maturity-onset Diabetes of the Young: An Update. *Clin. Lab*. Vol. 52. 2006.

OLIVEIRA, C. S. V., et al. Diabetes Mellitus do Tipo MODY. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. Vol. 46, N. 2. 2002.

OWEN, K., et al. Maturity-Onset Diabetes of the Young: from Clinical Description to Molecular Genetic Characterization. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 15, N. 3. 2001.

PAVKOV, M. E., et al. Changing patterns of type 2 diabetes incidence among Pima Indians. *Diabetes Care*. Vol. 30, N. 7. 2007.

PEARSON, E. R. Genetic Cause of Hyperglycaemia and Response to Treatment in Diabetes. *The Lancet*. Vol. 362. 2003.

PONTOGLIO, M., et al. HNF1- α controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *European Molecular Biology Organization Reports*. Vol. 1, N. 4. 2000.

RAVI, P., et al. Etiology of Early-Onset Type 2 Diabetes in Indians: Islet Autoimmunity and Mutations in Hepatocyte Nuclear Factor 1 and Mitochondrial Gene. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 92, N. 7. 2007.

REGITANO, L. C. A. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares*. In: REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Eds) *Biologia Molecular Aplicada a Produção Animal*. Brasília. Embrapa. Informação Tecnológica. 2001.

REIS, A. F.; VELHO, G. Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica*. Vol. 46, N. 4. 2002.

RISSANEN, J., et al. Variants in the hepatocyte nuclear factor-1alpha and -4alpha genes in Finnish and Chinese subjects with late-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care*. Vol. 23. 2000.

RUANO, E. G. *Estudio genético de diabetes en la población de Castilla y León*. Tese de doutorado. Universidad d Salamanca. Salamanca, 2010.

RYFFEL, G. U. Mutations in the Human Genes Encoding the Transcription Factors of the Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)1 and HNF4 Families: Functional and Pathological Consequences. *Journal of Molecular Endocrinology*. Vol. 27. 2001.

SAGEN J. V., et al. From clinicogenetic studies of maturity-onset diabetes of the young to unravelling complex mechanisms of glucokinase regulation. *Diabetes*. Vol. 55. 2006.

SAKER, P. J. Low Prevalence of the Mitochondrial Transfer RNA Gene tRNA Leu (UUR) Mutation at Position 3243bp in UK Caucasian Type 2 Diabetic Patients. *Diabetic Medicine*. Vol. 14. 1997.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. *Cad. Saúde Pública*. Rio de Janeiro, Vol. 19, N. 1. 2003.

SCHNYDER, S., et al. Genetic Testing for Glucokinase Mutations in Clinically Selected Patients with MODY: a Worthwhile Investment. *Swiss Medical Weekly*. Vol. 135. 2005.

SCOTT, L. J., et al. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science*. Vol. 316., 2007.

SHEKHER, A. A Prevalent Amino Acid Polymorphism at Codon 98 (Ala98Val) of the Hepatocyte Nuclear Factor-1alpha is Associated with Maturity-Onset Diabetes of the Young and Younger Age at Onset of Type 2 Diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care*. Vol. 28. 2005.

SHIH, D. Q., et al. Loss of HNF-1alpha Function in Mice Leads to Abnormal Expression of Genes Involved in Pancreatic Islet Development and Metabolism. *Diabetes*. Vol. 50. 2001.

SLADEK, R., et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. Vol. 445. 2007.

STAIGER, H. et al. Pathomechanisms of Type 2 Diabetes Genes. *Endocrinology Reviews*. Vol. 30. 2009.

STOFFERS, D. A., et al. Early-Onset Type-II Diabetes Mellitus (MODY4) Linked to IPF1. *Nature Genetics*. Vol. 17, N. 2. 1997.

TATTERSALL, R. B. Mild Familial Diabetes With Dominant Inheritance. *Quarterly Journal of Medicine*. Vol. 43. 1974.

_____, et al. A Difference Between the Inheritance of Classical Juvenile-Onset and Maturity-Onset Type Diabetes of Young People. *Diabetes*. Vol. 24. 1975.

URHAMMER., S. A., et al., Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in Danish Caucasians with late-onset NIDDM. *Diabetologia*. Vol. 40. 1997.

URHAMMER, S. A., et al. The Ala/Val98 Polymorphism of the Hepatocyte Nuclear Factor-1{alpha} Gene Contributes to the Interindividual Variation in Serum C-Peptide Response during an Oral Glucose Tolerance Test: Evidence from Studies of 231 Glucose-Tolerant First Degree Relatives of Type 2 Diabetic Proband. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol 83, N. 12. 1998.

VAXILLAIRE, M., et al. A Gene for Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) Maps to Chromosome 12q. *Nature Genetics*. Vol. 9, N. 4. 1995.

VAXILLAIRE, M., et al. Genetic Basis of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. Vol. 35. 2006.

VELHO, G., et al. Genetic, Metabolic and Clinical Characteristics of Maturity Onset Diabetes of the Young. *European Journal of Endocrinology*. Vol. 138, N. 3.1998.

_____, et al. Bases Genéticas do Diabetes Tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. Vol. 46, N. 4. 2002.

WANG, H., et al. Dominant-Negative Suppression of HNF-1a Function Results in Defective Insulin Gene Transcription and Impaired Metabolism-Secretion Coupling in a Pancreatic β -Cell Line. *EMBO Journal*. Vol. 17. 1998.

_____, et al. Molecular Targets of a Human HNF1 α Mutation Responsible for Pancreatic β -Cell Dysfunction. *EMBO Journal*. Vol. 19. 2000.

WHO. Diabetes mellitus. Report of a WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*. Vol. 310. 1965

_____. Expert Committee. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. 2^o relatório. *Technological Report*. 646, WHO, Geneva.1980.

_____. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *WHO/NCD/NCS/99.2*. Geneva, 1999.

_____. The Burden of Mortality Attributable to Diabetes. *Diabetes Care*. Vol. 28, N. 9. 2005.

_____. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/IDF Consultation. *WHO Document Production Services*. Geneva, Switzerland. 2006.

WHO/IDF. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia (Report): *World Health Organization / International Diabetes Federation*. 2006.

WILD, S., et al. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030. *Diabetes Care*. Vol. 27, N. 5. 2004.

WINCKLER, W., et al.. Association of common variation in the HNF1alpha gene region with risk of type 2 diabetes. *Diabetes*. Vol. 54. 2005.

YAMAGATA, K., et al. Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha Gene in Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY 3). *Nature*. Vol. 384. 1996(a).

_____, et al. Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Gene in Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY 1). *Nature*. Vol. 384. 1996(b).

_____, et al. Mutation P291fsinsC in the Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-1a is Dominant Negative. *Diabetes*. Vol. 47. 1998.

ZEGGINI, E., et al. Meta-Analysis of Genome-Wide Association Data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci fo type 2 diabetes. *Nat Genet*. Vol. 40, N. 5. 2008.

ZIMMET, P. Z., et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med*. Vol. 11, N. 3. 1994.

APÊNDICE

MATERIAL E MÉTODOS

Após levantamento bibliográfico para a identificação dos genes relacionados ao diabetes tipo MODY, foram coletados os dados de sequência nucleotídica do gene HNF1 α a partir do Banco de Dados NCBI - “*National Center for Biotechnology Information*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para cada éxon foram construídos oligonucleotídeos específicos *sense* e *antisense* flanqueadores, correspondentes a toda sequência a ser amplificada e analisada.

A partir de uma consulta de rotina, pacientes com fenótipo suspeito de MODY foram recomendados pelo Doutor Fábio Quilillo Milleo (CNS: 122087618570008) (Instituto de Pesquisa Aplicada em Medicina - INSPAM). Posteriormente, foi realizada análise minuciosa destes pacientes (genealogia e dados clínicos disponíveis) para realizar triagem definitiva antes das análises moleculares. Esta pesquisa segue com aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEPG (COEP-UEPG), protocolo de pesquisa número 00884/09, parecer número 14/2009 (Anexo II), os pacientes envolvidos estavam cientes dos objetivos do projeto e de comum acordo (Termo de Consentimento Livre Esclarecido -Anexo III).

Os pacientes selecionados para as análises moleculares foram encaminhados para coleta de 5 mL de sangue em tubo tipo falcon de 15 mL, contendo 50 μ L de EDTA 15%. As amostras armazenadas sob refrigeração foram levadas até o laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG, onde foram estocadas em ultra-freezer a temperatura de -80°C até o processamento das mesmas.

O protocolo utilizado nos processos de extração de DNA a partir de leucócitos do sangue é uma adaptação ao recomendado por REGITANO (2001). Para obtenção de leucócitos, as células vermelhas do sangue foram gradualmente desintegradas em tampão apropriado (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM), e o resíduo celular precipitado por centrifugação (700 g, 10 min). As células brancas do sangue foram ressuspensas em solução contendo 500 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, 0,5% SDS, 2 mg de proteinase K e então incubadas a 55°C até que o pellet fosse dissolvido (overnight). Após a incubação, foram adicionados 240 μ L NaCl 5M e 210 μ L de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6 + EDTA 1mM pH 8,0). O material foi agitado por inversão dos tubos até formar pequenos coágulos de proteína e

centrifugado por 15 minutos a 16.000 g, para promover a precipitação das proteínas. O sobrenadante, contendo o DNA, foi recuperado e precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado. Logo em seguida, o material foi lavado com etanol 70% gelado e centrifugado novamente. Posteriormente, o precipitado foi ressuscitado em 250 μ L de solução TE + RNase (10 mg/ml) e incubado por uma hora a 37 °C. As amostras foram quantificadas em NanoVue[®] (GE Healthcare) e armazenadas a -20 °C até utilização.

Para amplificação dos éxons do gene *HNF1 α* , foram preparadas reações utilizando aproximadamente 40 ng de DNA molde, tampão de reação 1X (contendo 200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 U de enzima DNA polimerase (Taq DNA Polimerase Invitrogen[®]), 20 μ M de cada primer (sense e antisense), 1.5 mM MgCl₂, 0.08 mM de cada dNTP (Invitrogen[®]). A reação de amplificação dos segmentos gênicos (reação em cadeia da polimerase - PCR) foi realizada em termociclador Biocycler em programa composto por 35 ciclos dos passos de desnaturação (1min a 95°C) seguido de anelamento (45seg a 63°C) e polimerização nucleotídica (1min a 72°C). Os primers utilizados nas reações de PCR e sequenciamento foram desenhados a partir da sequência do gene *HNF1 α* depositada no *GenBank*, com auxílio do software *Oligo Analyzer 3.0* (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/). (TABELA 4)

TABELA 4. PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS DO GENE *HNF1 α*

Éxon	Primer forward (5' \square 3')	Primer reverse (5' \square 3')	Produto amplificado
1	TGCAAGGAGTTTGGTTTGTG	GCCCCTCTAGGCTCTCCTG	484 pb
2	AGCAGATCCCGTCCTTGC	GCGGGGTAGGGTCATTACTT	250 pb
3	AGTGGCCAGTACCCCACTC	ACCAAACCAGCACTGTTTCC	261 pb
4	GACTGTCAATTGCCCAAGGT	CCTTGTCCCCACATACTACT	430 pb
5	TAAATGCAGTCCCAGCCTTC	CAGCTGCTGAGACCTACGAG	499 pb
6	AGCTGGTGAGTGTCCCTTGCT	GCACAGTGACTGGTCCAGAG	480 pb
7	GGCTCTGGGAAGGAGAGG	ACCCTCAATCACGGAAACAC	423 pb
8 e 9	GGTTTCTGGCCTCCTCCAG	ACAGTGACGGACAGCAACAG	687 pb
10	GAGGCTCCCTTTGAAGAACC	GATGCATCAGAGCAGAGTGG	448 pb

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para a verificação dos tamanhos dos fragmentos. Os fragmentos corretamente amplificados foram purificados utilizando-se o kit comercial High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche[®], Germany) e quantificados em NanoVue[®] (GE Healthcare).

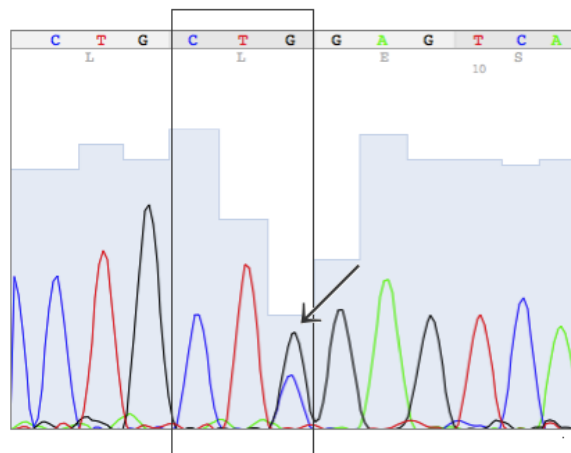
Aproximadamente 60 ng de DNA foram sujeitos a sequenciamento nucleotídico em sequenciador automático pela empresa Ludwig Biotecnologia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), submetidos a reações com os oligonucleotídeos *sense* e com os *antisense*.

Os resultados obtidos foram analisados com os programas CLC Sequence Viewer 6 (©CLC bio, Aarhus, Dinamarca) e 4Peaks 1.7 (©Mekentosj, Amsterdam, Holanda). Para alinhamento e comparação de homologia das sequências, foi utilizada a sequência de referência do gene *HNF1 α* , obtida a partir da plataforma *Consensus Coding Sequence Database* - NCBI, entrada CCDS9209.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

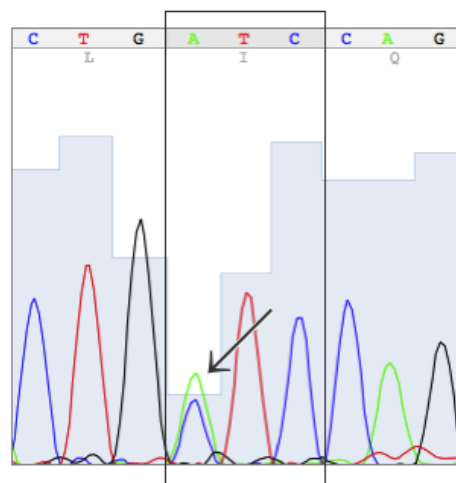
ANEXO I

Cromatogramas dos pacientes analisados neste estudo. Os nucleotídeos envolvidos nos SNPs (Polimorfismos de nucleotídeo único) estão indicados com uma flecha e o códon responsável, delimitado por uma caixa.

a) CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO L17L E O CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NOS PACIENTES A, B, F e H



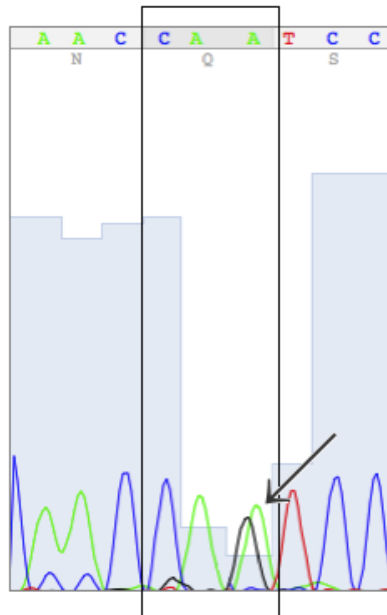
b) CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO I27L E O CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NOS PACIENTES A, B e F



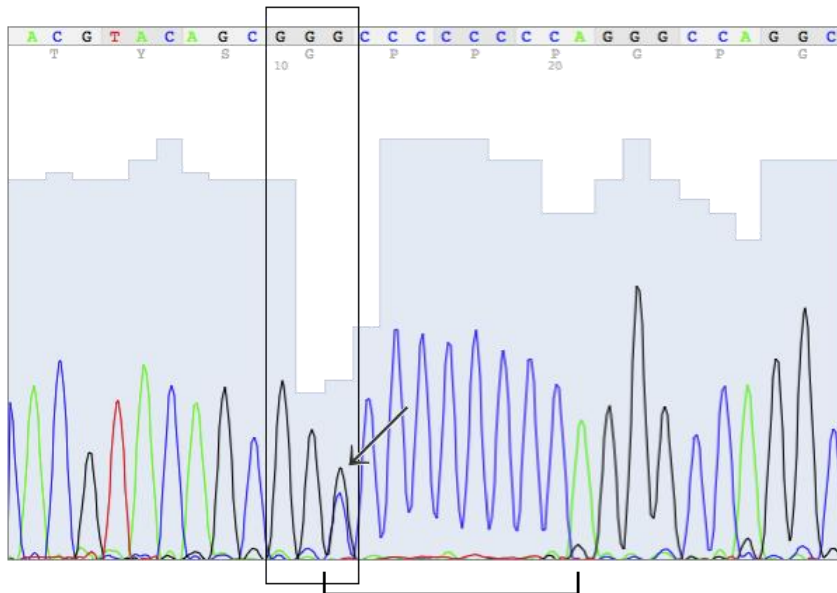
c) CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO A98V E O CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NO PACIENTES A



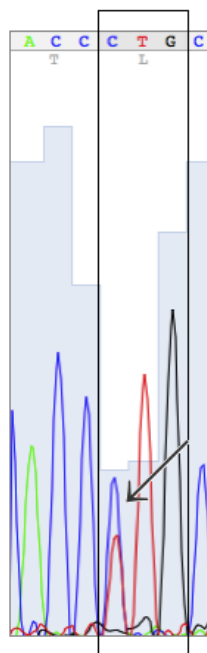
d) CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO Q141Q E O CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NO PACIENTES E e G



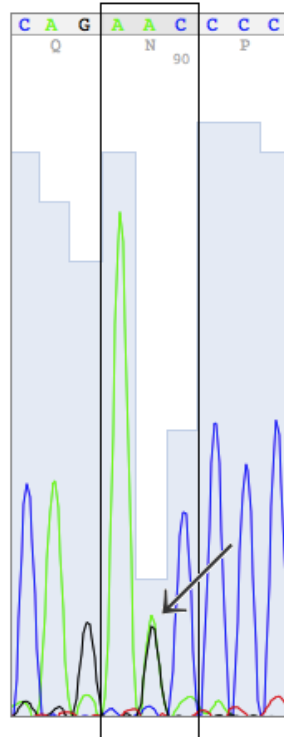
e) CROMATOGRAMA DESTACANDO A CAUDA POLI-C E EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO G288G E SEU RESPECTIVO CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NO PACIENTES B, C, E e F



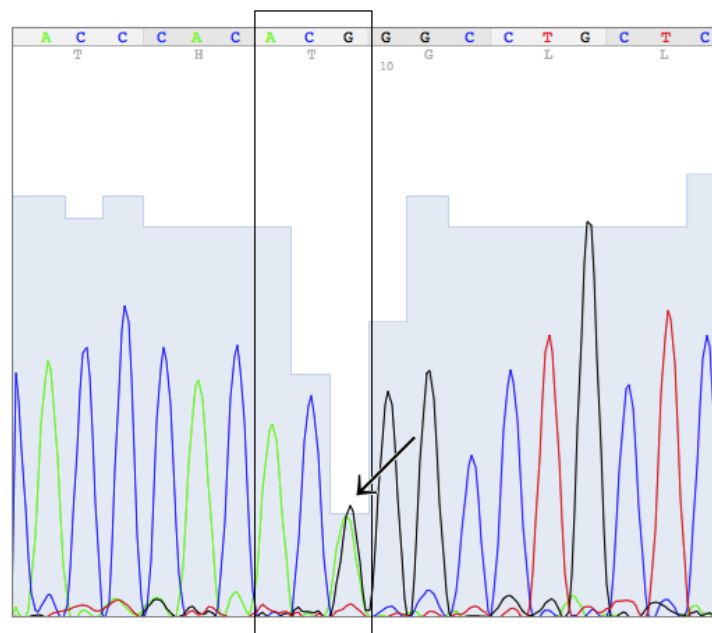
f) CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO L459L E SEU RESPECTIVO CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NO PACIENTES E



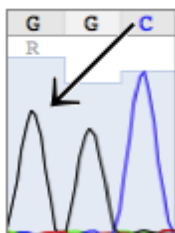
g) CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO S487N E SEU RESPECTIVO CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NO PACIENTE E



h) CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO T515T E SEU RESPECTIVO CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NO PACIENTE E



i) CROMATOGRAMA EVIDENCIANDO A MUTAÇÃO S574G E SEU RESPECTIVO CÓDON ENVOLVIDO, PRESENTE NO PACIENTE A



ANEXO II



PARECER Nº 14/2009
Protocolo: 00884/09

Em reunião ordinária, realizada dia 30 de abril de 2009, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "**Prospecção de mutações gênicas relacionadas ao Diabetes mellitus tipo MODY em famílias da região dos Campos Gerais**". de responsabilidade da pesquisadora Viviane Nogaroto Vicari.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).


Data para entrega do relatório final: 30 de julho de 2010

Ponta Grossa, 30 de Abril de 2009.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Prof. MSc. Marlene Harger Zimmermann
Coordenadora

ANEXO III

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP
--	--

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)
 PESQUISA COM SERES HUMANOS

Eu, _____, original da cidade de _____, Estado ____, nascido (a) no dia/mês/ano _____, portador (a) do documento de identidade número _____, C.P.F número _____, residente à Rua _____, número _____, complemento _____, no Bairro _____, localizado no município de _____, Estado ____, concordo com a minha participação no projeto de pesquisa intitulado “Prospecção de mutações gênicas relacionadas ao Diabetes mellitus tipo MODY em famílias da região dos Campos Gerais” à realizar-se na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Laboratório de Citogenética e Evolução, sob supervisão da Dra. Viviane Nogaroto Vicari, do Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni e do Dr. Fábio Quirillo Milléo. Esta pesquisa está sob a responsabilidade da Dra. Viviane Nogaroto Vicari, aluna de Prodoc/Capes da mesma Instituição, pelo Programa de pós-graduação em Biologia Evolutiva, à encontrar-se pelo telefone (42) 3220-3739 / celular (42) 9965-6338. O médico Dr. Fábio Quirillo Milléo, responsável pelo tratamento clínico do paciente, encontra-se pelo telefone (42) 3222 9444.

Estou ciente de que o objetivo deste trabalho consiste em coletar 5 ml de sangue, a partir do qual será extraído o DNA total e este será utilizado como molde em reações de amplificação de genes específicos relacionados ao Diabetes tipo MODY, como fator o hepatocítico nuclear 4 α , a enzima glicoquinase, o fator hepatocítico nuclear 1 α , o fator promotor da insulina, o fator hepatocítico nuclear 1 β e o NeuroD/Beta2. A partir das sequências fornecidas pelo sequenciamento nucleotídico dos fragmentos amplificados, será realizada uma busca por mutações que possam estar presentes nestes genes citados acima. Caso haja a identificação de alguma mutação relacionada ao MODY, o médico

responsável e o paciente serão informados podendo, desta maneira, serem tomadas as devidas providências acerca de um tratamento mais adequado, o qual só trará benefícios ao paciente.

Os resultados destes trabalhos poderão ser apresentados à comunidade científica em geral, respeitando toda a informação adquirida que será tratada como confidencial pelos pesquisadores. Apenas pacientes voluntários serão incluídos como participantes deste estudo, no qual qualquer tipo de identificação pessoal será mantida sob sigilo e não constará em nenhum relatório ou publicação científicos ou estará disponível a terceiros (seguradoras, empregadores). Os procedimentos e tratamentos específicos, quando identificadas as mutações, não trarão ônus nenhum aos pacientes participantes deste estudo.

Estou ciente ainda de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja penalização alguma ou prejuízo ao meu tratamento. Da mesma forma, não haverá qualquer dano e, que em caso de reclamação, ou recurso poderei entrar em contato com a secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa, pelo telefone (42) 3220-3108, Av. Gen. Carlos Cavalcanti, n ° 4748, Cep-84030-900, Bloco M, Sala 12, e-mail: coep@uepg.br.

Li, portanto, este termo, fui orientado (a) quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nenhum valor econômico por minha participação.

		Dra. Viviane Nogaroto Vicari
Voluntário (a)		(Pesquisadora responsável- Prodoc/Capes)

Dr. Fábio Quirillo Milléo
(Clínico responsável)

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
(Supervisor da Pesquisa)

Ponta Grossa, ____ de _____ de 20__.