

ANA GREGÓRIA FERREIRA PEREIRA DE ALMEIDA

**INVESTIGAÇÃO DE MODY 3 EM PACIENTES DO
AMBULATÓRIO DE DM 1 DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO (HUUFMA).**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde Materno-Infantil da
Universidade Federal do Maranhão,
para a obtenção do Título de Mestre
em Saúde Materno-Infantil.

Área de Concentração: Avaliação
Clínica-laboratorial

Orientadores: Profa. Dra. Emygdia
Rosa do Rêgo Barros Pires Leal
Mesquita

Prof. Dr. Manuel
dos Santos Faria

Coordenadora: Profa. Dra. Maria
Bethânia da Costa Chein

São Luís

2012

Almeida, Ana Gregória Ferreira Pereira de

Investigação de MODY em pacientes do ambulatório de DM 1 do Hospital
Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA)

x-fls.:il.

Orientadora: Emygdia Rosa Leal Mesquita

Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, Universidade
Federal do Maranhão, 2012.

1.Maturity Onset Diabetes of Young. I. Mesquita, Emygdia Rosa Leal
(orientadora). II. Título.

CDU: XXX.X.XXX.X

**INVESTIGAÇÃO DE MODY 3 EM PACIENTES DO AMBULATÓRIO DE DM 1 DO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
(HUUFMA).**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Materno-
Infantil da Universidade Federal do
Maranhão, para a obtenção do Título de
Mestre em Saúde Materno-Infantil

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública,
considerou a candidata aprovada em: ____/____/____.

Profa. Dra. Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal Mesquita (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Maria Honorina Cordeiro Lopes (Examinador)
PPG de fora do PPGSMIN

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

SÃO LUÍS
2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luis e Iracy Pereira pelo amor e confiança dispensados a mim por toda a vida.

Ao meu marido José Carlos, pelo amor, paciência e dedicação dispensados a minha pessoa.

Ao meu irmão João e irmãs Maricleide, Conceição e Syntia, por estarem sempre me incentivando e me ajudando nas horas de aperto.

Aos meus orientadores, a Profa. Dra. Emygdia Rosa do Rego Barros Pires Leal Mesquita, pelo acolhimento e orientação no Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade (LEGH) e o Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria, pela capacidade que tem de fomentar em seus orientandos o desejo de enfrentar novos desafios e por toda dedicação dispensada a mim, para meu crescimento como profissional e pessoa.

Ao Bruno de Almeida Nunes, amigo e companheiro de mestrado, pela colaboração indispensável em toda a pesquisa, tirando dúvidas, levantando questionamentos e, junto, buscando soluções a todos os problemas encontrados na realização da pesquisa.

À Fernanda Oliveira Graça, estagiária do curso de Ciências Biológicas, que durante esses dois anos de Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade (LEGH), foi minha companheira de bancada e orientanda de término de curso.

A minha profa. Dra. Maria Honorina Cordeiro Lopes, por toda dedicação dispensadas a mim, não só no campo profissional, mas também no pessoal.

A minha profa. Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa por todo o incentivo desde o começo na faculdade de Medicina até hoje, em todos os momentos de minha vida.

Aos meus amigos Ana Lourdes e Josué Viana, pela amizade e carinho, sempre me ajudando quando eu precisava ou não.

Aos companheiros de turma, em especial ao Gilvan Cortês Nascimento e Rosângela Maria Lopes de Sousa, que com seu carinho, sempre estiveram ao meu lado ajudando e resolvendo problemas ou apenas conversando para aliviar a tensão.

A todos os professores do Mestrado, que sempre me ajudaram em tudo que precisei, em especial à Profa. Dra. Maria Bethânia da Costa Chein.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil em especial a D. Helena por tirar todas as dúvidas e está sempre a disposição para nossos questionamentos.

Aos colegas do Hospital Geral, em especial a Dra. Jacqueline Ribeiro, Dr. Luis César e D. Graça que sempre que eu precisei faltar ao ambulatório ou à enfermaria, me deram suporte para não haver prejuízo no caminhar do serviço.

“A arte é longa, a vida breve, a ocasião fugitiva, a experiência falaz, o juízo dificultoso. Não basta que o médico faça por sua vez quanto deve fazer, se por outro lado não coincidem ao mesmo objeto, os assistentes e as circunstâncias exteriores restantes.”

Hipócrates

RESUMO

Maturity onset diabetes of young 3 (MODY 3) é o mais frequente diabetes mellitus (DM) monogênico autossômico dominante causado por mutações no gene *HNF 1A* e caracterizado por defeito na secreção de insulina, diminuição no limiar renal de glicose e sensibilidade a sulfonureia, na maioria das vezes. Com frequência é diagnosticado erroneamente como DM 1 ou DM 2. Frente a esta evidência este trabalho tem como objetivo a investigação das mutações do gene *HNF 1A* em pacientes atendidos no ambulatório de DM1 do Hospital Universitário da UFMA São Luís – MA (HUUFMA), assim como caracterizar epidemiologicamente a população de estudo, além de identificar e descrever as mutações encontradas no gene, correlacionando-as com as complicações crônicas próprias do DM que estes pacientes possam apresentar. Foram avaliados por meio de questionário 60 pacientes com diagnóstico prévio de DM 1, destes, 20 pacientes foram selecionados por suas características clínicas sugestivas de MODY para análise molecular do gene *HNF 1A* pela técnica de sequenciamento. Onze pacientes foram do sexo feminino e nove do sexo masculino com uma média de idade de $24,35 \pm 6,91$ anos. Destes, 25% apresentavam retinopatia, 55%, nefropatia, 35% neuropatia e 15% cardiopatia isquêmica. Dentre as variações gênicas, foram encontradas 53 mutações, destas, uma deleção no promotor. Das 52 variações que ocorreram nos éxons, 15 eram silenciosas. Entre as não-silenciosas, observaram-se 29 *missense*, sete deleções e uma *nonsense*. Destas, 11 mutações encontraram-se na isoforma A, duas na isoforma AB e 24 na isoforma ABC. Em relação aos domínios da proteína, verificou-se: uma mutação *missense* no domínio de dimerização, nove mutações no domínio de ligação do DNA e 25 mutações no domínio de transativação. Ao se correlacionar os tipos de mutações, suas localizações no gene ou em seus respectivos domínios de proteína com as complicações crônicas típicas do DM, não se observou qualquer relação. Contudo, foi observado que pacientes apresentando associação de mutações *frameshift* com *missense* no domínio de transativação apresentavam um pior controle metabólico que pacientes com mutações *missense* no mesmo domínio. Com estes resultados concluímos que alterações no gene *HNF 1A* são muito frequentes entre os paciente com DM 1 com características típicas de MODY, sugerindo que o MODY 3 possa ser causa do DM de muitos destes pacientes e que o tipo de mutação e sua localização no domínio de proteína pode ter associação com o controle metabólico destes pacientes.

Palavras-chaves: Diabetes mellitus; *HNF 1A*; MODY 3

ABSTRACT

Maturity onset diabetes of young 3 (MODY 3) is the most common monogenic autosomal dominant diabetes caused by mutations in the *HNF 1A* and characterized by a defect in insulin secretion, decreased renal threshold for glucose and sensitivity to sulfonureia. It is often misdiagnosed as DM 1 or DM 2. By this evidence, this study aims to investigate the *HNF 1A* gene mutations in patients treated at the outpatient clinic of the University Hospital of DM1 UFMA Sao Luis - MA (HUUFMA), characterize epidemiologically the study population, and identify and describe the mutations found in the gene, correlating them with the chronic complications of diabetes that these patients may have. We evaluated by questionnaire 60 patients with a previous diagnosis of DM 1. These, 20 patients were selected for their clinical features suggestive of MODY for molecular analysis of the *HNF 1A* gene by sequencing technique. Eleven patients were females and nine males with a mean age of 24.35 ± 6.91 years. Twenty five per cent had retinopathy, 55 %, nephropathy, neuropathy 35 % and 15 % ischemic heart disease. Among the gene variations were found 53 mutations, of these, a deletion in the promoter. Of the 52 variations that occurred in exons, 15 were silent. Among the non- silent, there were 29 *missense* mutations, seven deletions and one *nonsense*. Of these, 11 mutations were found in the A isoform, two in the AB isoform and 24 in the ABC isoform. Regarding the fields of protein, it was found: one missense mutation in the dimerization domain, nine mutations in the DNA-binding domain and 25 mutations in the transactivation domain. By correlating the types of mutations, their locations in their respective gene or protein domains with typical chronic complications of diabetes, there was no relationship. However, it was observed that patients with frameshift mutations associated with missense mutations in the transactivation domain had a worse metabolic control than patients with missense mutations in the same domain. With these results we conclude that changes in gene *HNF 1A* are very common among diabetic patients with a typical characteristics of MODY in this sample, suggesting that the MODY 3 can be cause of DM in many of these patients and the type of mutation and its location in the field protein may be associated with metabolic control in these patients.

Keywords: Diabetes mellitus; HNF 1A; MODY 3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Célula pancreática e proteínas relacionadas ao MODY.	21
Figura 2:	Localização do gene <i>HNF1A</i> no genoma humano.	24
Figura 3:	Estrutura genômica do <i>HNF 1A</i> mostrando os três domínios funcionais da proteína HNF 1A.	25
Figura 4:	Redes regulatórias envolvendo o <i>HNF 1A</i> .	26
Figura 5:	Estrutura do complexo HNF 1A/DNA.	27
Figura 6:	Representação da estrutura da proteína HNF 1A por domínios funcionais em pacientes suspeitos de MODY.	41
Figura 7:	Eletroferograma do paciente AG 03 mostrando a deleção A39fsdelC.	42
Figura 8:	Eletroferograma do paciente AG 08 mostrando a deleção Q157fsdelG.	42
Figura 9:	Eletroferograma do paciente AG 03 mostrando a deleção V172fsdelG.	43
Figura 10:	Eletroferograma do paciente AG13, mostrando a deleção E390fsdelG,	43
Figura 11:	Eletroferograma do paciente AG14, mostrando a deleção E391fsdelG,	44
Figura 12:	Eletroferograma dos pacientes AG11 e AG14, mostrando mutação <i>missense</i> I27L, localizada no éxon 01.	44
Figura 13:	Eletroferograma do paciente AG15, mostrando mutação <i>missense</i> A98V, localizada no éxon 01.	45
Figura 14:	Comparação entre as médias de idade atual, idade de início e tempode diabetes para os diferentes grupos de domínio de proteína.	51
Figura 15:	Comparação entre as médias de dose total de insulina por quilograma de peso (Dose TTI) para os diferentes grupos de domínio de proteína.	51
Figura 16:	Comparação entre as médias de hemoglobina glicada (Hb glicada) para os diferentes grupos de domínio de proteína.	52
Figura 17:	Comparação entre as médias de depuração de creatina (DC) para os diferentes grupos de domínio de proteína.	52

Figura 18:	Comparação entre as médias de dose de proteinúria para os diferentes grupos de domínio de proteína.	53
Figura 19:	Efeito de Interação entre as médias da hemoglobina glicada com as mutações dos tipos “ <i>Missense</i> ” e “ <i>Frameshift/Missense</i> ” para os diferentes grupos de domínio de proteína.	54
Figura 20:	Gráfico da correlação linear de Pearson das mutações exônicas com a idade de início do DM.	57
Figura 21:	Gráfico da correlação linear de Pearson das mutações exônicas com a proteinúria de 24h em pacientes com mutações no gene <i>HNF 1A</i> .	57
Figura 22:	Gráfico da correlação linear de Pearson das mutações exônicas com a depuração de creatinina em pacientes com mutações no gene <i>HNF 1A</i> .	58
Figura 23:	Alinhamento da proteína HNF 1A normal com as prováveis proteínas mutadas dos pacientes com mutações no gene <i>HNF 1A</i> .	59
Figura 24:	<i>Check Gel</i> dos produtos de PCR dos éxons 1, 2, 3, 4, 5,6, 10 e promotor 1 do gene <i>HNF 1A</i> .	95
Figura 25	<i>Check Gel</i> dos produtos de PCR dos éxons7, 8, 9, 10, promotor 1e 2 do gene <i>HNF 1A</i> .	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação do DM de acordo com ADA 1997	19
Tabela 2	Subtipos e caracterização genética do MODY.	22
Tabela 3	Sequência dos <i>primers</i> do gene <i>HNF1A</i> .	34
Tabela 4	Protocolo Pgem	35
Tabela 5	Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes com suspeita clínica de MODY. São Luís, Maranhão, 2011.	39
Tabela 6	Complicações crônicas apresentadas pelos pacientes com suspeita de MODY. São Luís, Maranhão, 2011	40
Tabela 7	Variações gênicas encontradas no gene <i>HNF 1A</i> dos pacientes em investigação de MODY. São Luís, Maranhão 2011	46
Tabela 8	Mutações silenciosas encontradas no gene <i>HNF 1A</i> dos pacientes em investigação de MODY. São Luís, Maranhão 2011.	48
Tabela 9	Classificação das mutações conforme a análise de ferramentas de bioinformática.	49
Tabela 10	Correlação entre os tipos de mutações com as complicações crônicas em pacientes com mutações no gene <i>HNF 1A</i> em São Luís, Maranhão, 2011.	55
Tabela 11	Correlação entre os tipos de mutações e seus respectivos domínios de proteína com as complicações crônicas em pacientes com mutações no gene <i>HNF 1A</i> em São Luís, Maranhão, 2011.	56

LISTA DE SIGLAS

AA	Aminoácido
ADA	<i>American Diabetes Association</i> (Associação Americana de Diabetes)
Anti-GAD	Anticorpo Antidescarboxilase do ácido glutâmico
AME	Associação Mundial de Editores Médicos
BLK	<i>Lymphoid tyrosine kinase gene</i> (Gene da Tirosina quinase específica de linfócitos B)
CEL	Gene da Lipase ester carboxil
CEP	Conselho de Ética e Pesquisa
CIEPM	Comitê Internacional de Editores de Periódicos Médicos
COPE	Comitê de Ética de Publicação
CEC	Conselho de Editores Científicos
DCCT	<i>Diabetes Control and Complication Trials</i>
DLT	Domínios de dimerização, ligação de DNA e transativação
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM 1	<i>Diabetes mellitus tipo 1</i>
DM 2	<i>Diabetes mellitus tipo 2</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOI	<i>Digital object identifier</i>
EUA	Estados Unidos da América
G	Grama
GCK	Glicoquinase
GLUT 2	<i>Glucose Transport 2</i> (Transportador de Glicose 2)
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HNF 1 ^a	<i>Hepatocyte nuclear factor 1alpha</i> (Fator de transcrição nuclear hepatocitário 1A)
HNF 1 ^β	<i>Hepatocyte nuclear factor 1beta</i> (Fator de transcrição nuclear hepatocitário 1 ^β)
HNF 4 ^a	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 alfa</i> (Fator de transcrição nuclear

	hepatocitário 4A)
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> (Federação Internacional de Diabetes)
IMC	Índice de Massa Corpórea
IPF 1	<i>Insulin promoter of factor</i> (Fator promotor de insulina 1)
Kb	Quilobases
Kg	Quilograma
KLF 11	<i>Kruppel – like factor 11</i> (Fator de transcrição tipo Kruppel)
LEGH	Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade
LT	Domínios de ligação de DNA e transativação
mmHg	Milímetro de mercúrio
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of Young</i> (Diabetes da maturidade com início na idade jovem)
Neuro D1/B2	Fator de diferenciação neurogênica
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NN	Rede neural
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAX 4	Gene <i>BOX</i> pareado
Pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação de Cadeia de Polimerase)
Polyphen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
PSIC	Posição específica de contagens independentes
RNA m	RNA mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SAPCE	Subcomissão da Associação de Publicações Científicas e Éticas
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBD	Sociedade Brasileira de Endocrinologia
SI	Sistema Internacional
SIFT	<i>Sorting intolerant from tolerant</i>

T	Domínio de transativação
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSH	Hormônio Tireoestimulante
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO**ABSTRACT**

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. <i>Diabetes Mellitus</i>	18
1.2. MODY	19
1.3. MODY 3	22
1.3.1. Gene <i>HNF 1A</i>	23
1.3.2. Proteína HNF 1A	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	30
3.1. Geral	30
3.2. Especifico	30
4. METODOLOGIA	31
4.1. Local do estudo	31
4.2. Tipo de estudo	31
4.3. Casuística	31
4.4. Aspectos éticos	31
4.5. Coleta de dados	31
4.6. Exames realizados	32
4.7. Avaliação Molecular	33
4.8 . Programas de Presunção de Patogenicidade das Mutações	36
4.9. Determinação das Complicações Crônicas	37
5. RESULTADOS	39
5.1. Caracterização clínica dos pacientes com suspeita de MODY	39
5.2. Descrição das mutações encontradas	40

5.3. Correlação das mutações encontradas nos seus respectivos domínios de proteína com a idade de diagnóstico, a idade atual, o tempo de doença, dose total de insulina usada pelo paciente, hemoglobina glicada, depuração de creatinina e proteinúria de 24h.	50
5.4. Correlações dos agrupamentos de mutação (MM e MFM) em seus respectivos domínios de proteína com a idade de diagnóstico, o tempo de doença, dose total de insulina usada pelo paciente, hemoglobina glicada, depuração de creatinina e proteinúria de 24h.	53
5.5. Correlações dos tipos de mutação com as complicações crônicas	54
5.6. Correlações dos tipos de mutações com seus respectivos domínios com as complicações crônicas	55
5.7. Avaliações da correlação entre as mutações exônicas e idade de diagnóstico, hemoglobina glicada, proteinúria de 24h e depuração de creatinina.	56
5.8. Alinhamento da proteína HNF 1A normal com as supostas proteínas mutadas	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7. ANEXOS	65
8. APÊNDICES	91
9. PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO	96
Nome do periódico com sua classificação na WEBQUALIS da CAPES (A1, A2, B1, B2 ou B3) na área de AVALIAÇÃO MEDICINA II	96
Normas Editoriais/Normas para os autores	96
Artigo propriamente dito	113
10. SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO	138
Nome do periódico com sua classificação na WEBQUALIS da CAPES (A1, A2, B1, B2 ou B3) na área de AVALIAÇÃO MEDICINA II	138
Normas Editoriais/Normas para os autores	138
Artigo propriamente dito	148

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Diabetes mellitus*

O *Diabetes mellitus* (DM) é considerado uma das grandes epidemias mundiais deste século, independente do desenvolvimento do país onde a doença acontece. Isto ocorre em decorrência de vários fatores, dentre eles cita-se: aumento da expectativa de vida, distorções alimentares, urbanização, processo de industrialização, sedentarismo e obesidade. Seu tratamento envolve a atuação de múltiplos profissionais e múltiplas drogas, variando de modificação do estilo de vida ao uso de insulina. Atualmente sua classificação é baseada conforme a etiologia em^{1,2}:

- ✓ DM 1 (*Diabetes mellitus tipo 1*), causado por reação auto-imune com destruição das células beta pancreáticas, estando ligado ao sistema do antígeno leucocitário humano (HLA), sendo responsável por 5 - 10% dos casos de DM;
- ✓ DM 2 (*Diabetes mellitus tipo 2*), aquele relacionado principalmente à resistência insulínica e obesidade, associado a destruição de células beta pancreáticas de forma lenta, tendo característica poligênica; responsável por cerca de 90% dos casos;
- ✓ outros tipos específicos que se subdividem em defeitos genéticos funcionais das células beta pancreáticas, defeitos genéticos na ação da insulina, doença do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidos por fármacos e agentes químicos, infecções, formas incomuns de diabetes imunomediados e outras síndromes genéticas relacionadas ao DM;
- ✓ DM Gestacional, que se caracteriza como uma disglícemia que ocorre durante a gestação. (Tabela 1).

Dentre os outros tipos específicos de DM, enfatizam-se as formas relacionadas aos defeitos genéticos funcionais das células beta-pancreáticas, em especial, ao diabetes monogênico da maturidade no jovem (MODY – *Monogenic onset diabetes of young*) que é subclassificado dependendo do gene acometido.

Tabela 1: Classificação do DM de acordo com ADA 1997

Tipo 1	Auto – imune Idiopático
Tipo 2	
Outros tipos	Defeitos genéticos da célula β Defeitos genéticos da ação da insulina Doenças do pâncreas exócrino Endocrinopatias Induzidas por fármacos ou químicos Infecções Formas incomuns de diabetes auto-imune Outras síndromes genéticas
Diabetes gestacional	

ADA: *American Diabetes Association*

1.2. MODY

Forma mais comum de diabetes monogênico, causado por mutações em diferentes genes envolvidos com a função das células beta pancreáticas, contando com 0,3 – 2,4% dos diabéticos³, mas frequentemente é confundido com o DM 1 ou 2. Sua prevalência é estimada em torno de 5% dos pacientes com DM 2⁴ e 10% entre aqueles com DM 1 em muitas populações europeias, dentre adultos e crianças⁵.

As descrições feitas de MODY são de famílias acompanhadas em estudos de *cohorts*, a maioria europeia (Região Escandinava, Itália, Inglaterra)^{6,7,8}.

Vaxillaire e Froguel⁹, em 2008, definiram que os cinco melhores critérios para diagnosticar ou sugerir MODY são:

- ✓ hiperglicemia, usualmente, antes de 25 anos de idade em no mínimo 1 e idealmente 2 membros da família;
- ✓ herança autossômica dominante, com transmissão vertical por pelo menos três gerações e um fenótipo semelhante compartilhado por membros da família;

- ✓ ausência de terapia insulínica por no mínimo 5 anos depois do diagnóstico ou níveis de peptídeo C com valores dentro da normalidade, mesmo em paciente em uso de insulina;
- ✓ os níveis de insulina frequentemente estão na faixa de normalidade, embora inapropriadamente baixo para o grau de hiperglicemia, sugerindo um defeito primário na função da célula beta;
- ✓ raramente estão associados a sobrepeso ou obesidade.

Em relação à idade precoce do diagnóstico, existe uma tendência clássica de considerar como suspeito aquele indivíduo cujo diagnóstico da hiperglicemia tenha sido feito antes dos 25 anos de idade. Entretanto, tem-se demonstrado que a idade de diagnóstico varia bastante em decorrência do momento e contexto em que é realizado o exame¹⁰. Ademais, pesquisas mostram que a idade de início do DM no MODY tem relação com algumas variantes de risco para DM 2, como filhos de mães com hiperglicemia durante a gestação, pais com DM 2, mas não portadores de mutação no gene, assim como alguns modificadores genéticos¹¹⁻¹⁴. Além do próprio padrão de herança autossômico dominante do MODY, que tem alta penetrância, visto que 95% dos indivíduos nascidos com uma mutação para MODY desenvolverão diabetes ou algum grau de hiperglicemia até os 55 anos de idade¹⁵. Neste sentido não é a idade do diagnóstico, mas sem dúvida os dados provenientes dos antecedentes familiares que devem nortear a suspeita clínica.

Recentemente foi publicado um modelo matemático de probabilidade de desenvolvimento de MODY para a determinação de realização do teste genético. Este modelo leva em consideração à idade de início da doença, a história familiar de DM, a terapêutica utilizada nos seis primeiros meses de doença e os níveis de hemoglobina glicada¹⁶.

Pesquisa em genética de famílias com MODY têm demonstrado que esta patologia não é uma única doença, mas uma síndrome clínica e geneticamente heterogênea em que pelo menos onze genes são acometidos (Figura 1) (Tabela 2). Estes genes codificam a enzima glicoquinase (GCK)¹⁷ e fatores de transcrição nucleares de hepatócitos como o 4 alfa (HNF4A)¹⁸, 1 alfa (HNF1A)¹⁹, 1 beta (HNF1 β)²⁰ e o fator de diferenciação neurogênica (neuro D1/beta 2)²¹ e ainda, fator promotor de insulina 1 (IPF1)²², o fator de transcrição like-Kruppel (KLF11)²³, gene

da lipase ester-carboxil (CEL)²⁴, gene *Box* pareado (PAX4)²⁵, gene da insulina²⁶ e gene da tirosina quinase específica de linfócitos B (BLK)²⁷.

Apesar da descoberta de todos estes genes responsáveis pelo MODY, pesquisas relatam que aproximadamente 11% dos pacientes com suspeita deste tipo de diabetes monogênico tenham etiologia genética ainda desconhecida²⁸.

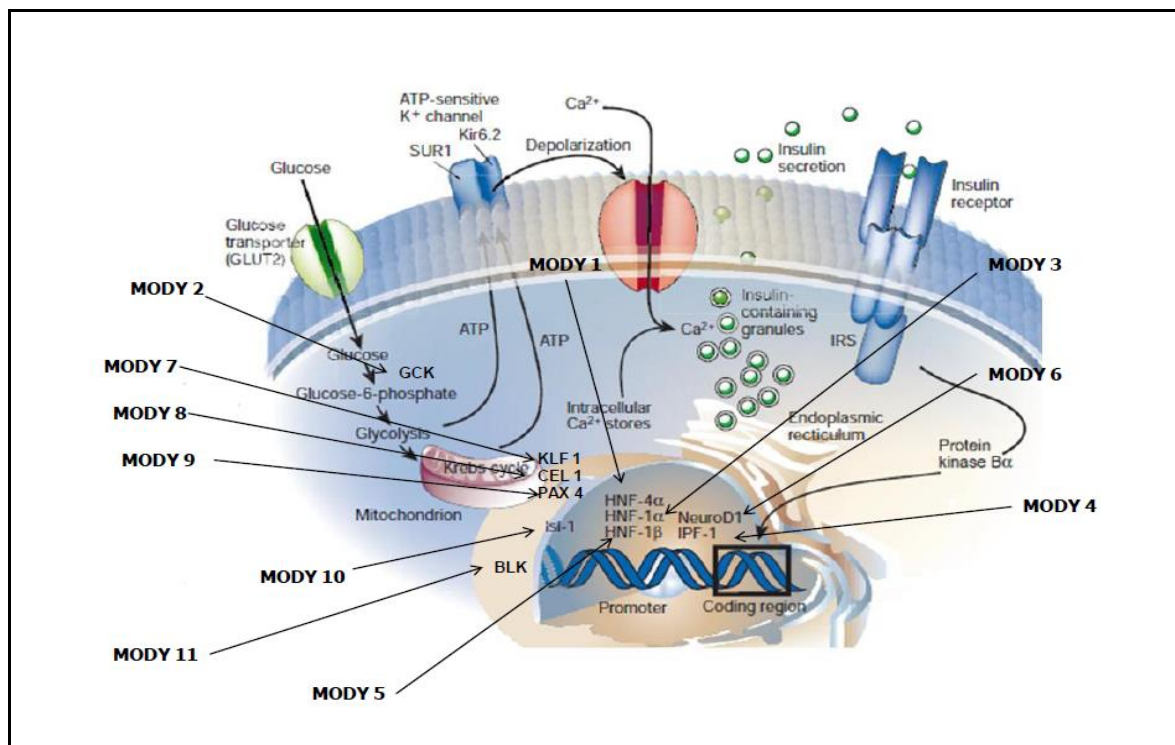


Figura 1: Célula pancreática e proteínas relacionadas ao MODY.

ATP: trifosfato de adenosina, K⁺: íon de potássio, SUR 1: receptor de sulfoniureia 1, KIR6.2: receptor KIR6.2, HNF 4α: fator nuclear hepatocitário 4α, GSK: enzima glicoquinase, HNF 1α: fator nuclear hepatocitário 1α, IPF1: fator ptomotor de insulina 1, HNF 1β: fator nuclear hepatocitário 11β, Neuro D1/β2: fator de diferenciação neurogênica D1/β2, KLF11: fator de transcrição *like* – Kruppel, CEL: gene da lipase ester-carboxil, PAX 4: gene *Box* pareado, ISL 1: gene da insulina, BLK: gene da tirosina quinase específica de linfócitos B, GLUT2: transportador de glicose 2, Ca²⁺: íon cálcio, IRS: receptor de insulina. Adaptado de Bell, 2001²⁹.

Tabela 2: Subtipos e caracterização genética do MODY

Tipo	Locus genético	Gene	Função	Frequência
MODY 1	20q	<i>HNF4A</i>	Fator de transcrição	Rara
MODY 2	7q	<i>GCK</i>	Enzima	8-65%
MODY 3	12q	<i>HNF1A</i>	Fator de transcrição	25-75%
MODY 4	13q	<i>IPF1</i>	Fator de transcrição	Rara
MODY 5	17q	<i>HNF1β</i>	Fator de transcrição	Rara
MODY 6	2q32	<i>Neuro D1/β2</i>	Fator de transcrição	Rara
MODY 7	2p25	<i>KLF11</i>	Gene	Rara
MODY 8	2p	<i>CEL</i>	Gene	Rara
MODY 9	7q32	<i>PAX4</i>	Gene	Rara
MODY 10	11p15.5	<i>ISL 1</i>	Gene	Rara
MODY 11	8p23	<i>BLK</i>	Gene	Rara

q: braço longo do cromossomo, p: braço curto do cromossomo, HNF 4A: fator nuclear hepatocitário 4A, GCK: enzima glicoquinase, HNF 1A: fator nuclear hepatocitário 1A, IPF1: fator promotor de insulina 1, HNF 1 β : fator nuclear hepatocitário 1 β , Neuro D1/ β 2: fator de diferenciação neurogênica D1/ β 2, KLF11: fator de transcrição *like* – Kruppel, CEL: gene *da lípase ester-carboxil*, PAX 4: gene *Box pareado*, ISL 1: gene da insulina, BLK: gene da tirosina quinase específica de linfócitos B, MODY: Diabetes da maturidade de início na idade jovem.

1.3. MODY 3

O MODY 3 é o tipo mais comum de DM monogênico em todo o mundo, com uma taxa de prevalência muito variável (25 a 75%), dependendo do país em que é estudado^{6,30-35}.

É a causa mais frequente deste tipo de DM na população adulta, podendo chegar a 65%⁸. Estima-se que seja responsável por 1% de todos os casos de DM no Reino Unido³⁶. Entre pacientes com DM 1, sua frequência é estimada entre 4,4 a 10%^{37,38}. Aqui no Brasil, existem relatos de famílias com diagnóstico de MODY, em especial o MODY 3³⁹⁻⁴², cujas famílias eram, em sua maioria, descendentes de japoneses e alemães. Em relação à região nordeste e, em especial ao Maranhão, não foi encontrado qualquer relato a respeito desta patologia.

Clinicamente, os pacientes apresentam uma grande heterogeneidade em sua expressão, até dentro da mesma família⁴³. Esta heterogeneidade de apresentação pode ser explicada por vários fatores, dentre os quais se destacam, em especial, a presença de algumas mutações determinando a evolução para complicações crônicas típicas do DM¹³ e outros modificadores genéticos¹⁴, sugerindo uma rede de traços genéticos importante na expressão do gene *HNF 1A*⁴⁴.

Alguns pacientes apresentam uma forma leve de DM, respondendo adequadamente a sulfoniureia, enquanto outros necessitam de insulina para um controle adequado⁴⁵. Estudos relatam que aproximadamente 63% dos pacientes com mutações no gene para MODY 3 desenvolvem DM aos 25 anos de idade⁴³. Ademais, os pacientes com MODY 3 apresentam uma menor absorção de glicose renal e maior glicosúria, devido a uma expressão reduzida do cotransportador de glicose de baixa afinidade e alta capacidade (SGLT2) que está sob controle direto do *HNF 1A*⁴⁶.

O mecanismo fisiopatológico para o desenvolvimento do MODY 3 se dá por mutações, principalmente heterozigóticas, no gene *HNF 1A*⁴². Os eventos que podem ocorrer para seu surgimento seriam a perda de função de um alelo, ocorrendo principalmente por haploinsuficiência, ou por disfunção em uma série de fatores de transcrição que mantêm a célula β -pancreática funcional⁴⁷.

1.3.1. Gene *HNF 1A*

O gene *HNF 1A* está localizado no braço longo do cromossomo 12, na posição 12q24.2 (Figura 2) e se estende ao longo de 23kb, possui 10 éxons e dois sítios de poliadenilação no extremidade 3', que junto do processamento alternativo dos éxons 6 e 7, podem gerar três isoformas ou isômeros diferentes A, AB, e ABC⁴⁸ (Figura 3):

- ✓ a isoforma A contém todos os 10 éxons e se expressa no fígado, rim, intestino e pâncreas fetal;
- ✓ a isoforma AB surge por processamento em um dos sítios de poliadenilação, compreendendo os éxons 1 a 6, sendo expresso nas ilhotas pancreáticas, rins e fígado, estes com menor expressão e
- ✓ a isoforma ABC é gerada por processamento do outro sítio de poliadenilação reunindo os éxons 1 a 7, expresso no pâncreas^{11,12}.

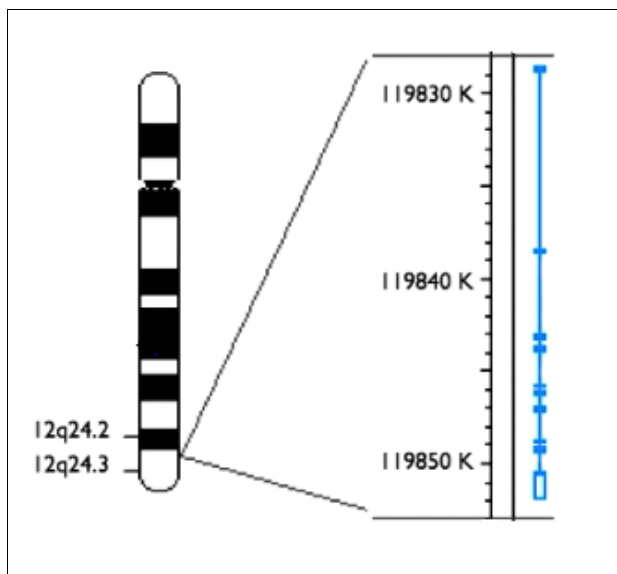


Figura 2: Localização do gene *HNF1A* no genoma humano. O detalhe em azul corresponde aos 10 éxons do gene. Adaptado de Bonatto 2010⁴⁹.

As três isoformas têm atividade, mas a AB e ABC têm uma capacidade ativadora de transcrição cerca de cinco vezes maior que A. Contudo, apenas a isoforma A tem seu perfil de expressão bem definido¹².

Este gene está implicado na codificação e função de outros genes, ativando:

- a transcrição do gene *HNF 4A* via promotor P2, que na sequência ativa sua própria transcrição, processo que funciona como um interruptor bioestável, de tal forma que haploinsuficiência de um ou outro, causa desligamento do circuito⁵⁰;
- outros genes como: gene *codificador de insulina*⁵¹, gene *promotor do GLUT 2*⁵², gene *transportador de glicose (GLUT 2)*⁵³, gene *transportador de aminoácidos* e enzimas mitocondriais como a piruvato quinase⁵⁴ e expressão de outros fatores de transcrição em ilhotas pancreáticas, incluindo aqueles envolvidos com MODY. Assim, sugere-se uma complexa rede hierárquica de elementos na transcrição da célula β .

Já foram descritas mais de 300 mutações neste gene, relacionadas ao MODY 3, mais comumente localizadas nos éxons 2 e 4 e com menor frequência nos éxons 5 e 10⁵⁵. A mutação mais frequentemente encontrada é a Pro291fs, localizada no éxon 4, em uma região *hotspot* do gene *HNF 1A*, que altera a leitura do RNAm gerando uma proteína truncada. Aproximadamente 43,5% das mutações de ponto são deaminações de metilcitosinas nos dinucleotídeos CpG⁵⁶. A penetrância de

mutações no *HNF1A* é de aproximadamente 65% com 25 anos, 93,6% com 50 anos e 98,7% com 75 anos⁵⁷.

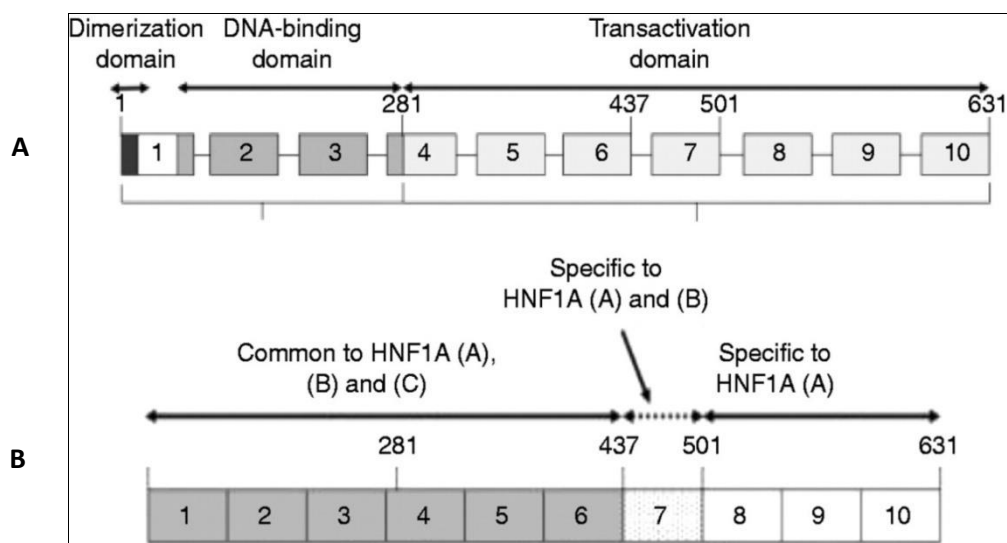


Figura 3: **A:** Estrutura genômica do *HNF 1A* mostrando os três domínios funcionais da proteína HNF 1A: domínio de dimerização (preto), domínio de ligação de DNA (cinza escuro) e domínio de transativação (cinza claro). **B:** Estrutura genômica do *HNF 1A* mostrando suas isoformas: isoforma ABC (cinza), isoforma AB (éxon 7) e isoforma A (éxons 8 – 10). Adaptado de BELLANNÉ-CHANTELOT e col., 2008¹³.

1.3.2. Proteína HNF 1 A

A proteína HNF 1A é um fator de transcrição contendo um homeodomínio⁴⁶, responsável pela codificação de fatores de transcrição em diferentes órgãos, sendo expressa no fígado, no rim, intestino e ilhotas pancreáticas. Está envolvida na expressão do gene da insulina, tendo importante função em sua secreção e na massa funcionante de células β ⁵⁸. Participa de uma rede de fatores de transcrição que regulam o desenvolvimento pancreático, assim como metabolismo dos ácidos graxos, proteínas e carboidratos (Figura 4 e 5). Esta proteína existe em forma de dímero, formando homodímeros (HNF 1A/HNF 1A) ou heterodímeros. Esses dímeros formam um complexo de duas moléculas de uma proteína denominada Cofator de dimerização do HNF 1A (CoDH)⁵⁹.

A proteína HNF 1A tem três domínios funcionais: 1) domínio de dimerização amino-terminal (1–32 aa); 2) domínio de ligação ao DNA, que envolve dois subdomínios, o primeiro compreendendo os aminoácidos 91 – 185 (domínio POU₅) e um segundo domínio de homeodomínio de sequência de aminoácidos conservada

compreendendo os resíduos 203 - 276 (domínio POU_H); 3) e um domínio de transativação carboxi-terminal (282 – 631 aa). O domínio de dimerização, permite a ligação e dimerização ao DNA e o domínio de transativação é aquele responsável pela transcrição do DNA. Já o domínio de ligação ao DNA, formado por dois outros domínios, POU_S e POU_H, como o próprio nome diz é responsável por sua ligação ao DNA. O domínio POU_S é formado por cinco α -hélices e o POU_H, por três α -hélices (Figura 3 e 5)^{60,47,61}.

Esta proteína tem função importante na secreção da insulina estimulada por glicose, assim como na sua estocagem³⁵. Ademais, regula um grande número de genes específicos do fígado, tais como: aqueles que codificam a albumina, a α 1-antitripsina e o β – fibrinogênio, assim como genes pancreáticos envolvidos no transporte e metabolismo da glicose, incluindo aqueles que codificam a piruvato quinase⁵⁴ e GLUT 2⁵³. Além disso, a HNF 1A tem extrema importância na regulação de outros fatores de transcrição como o HNF 4A, PDX-1 e Neuro D1/Beta 2⁶². Em relação ao HNF 4A, no pâncreas, o HNF 1A ativa a transcrição do gene *HNF 4A* via promotor P2, que, em contrapartida, ativa a transcrição do *HNF 1A*⁵⁰.

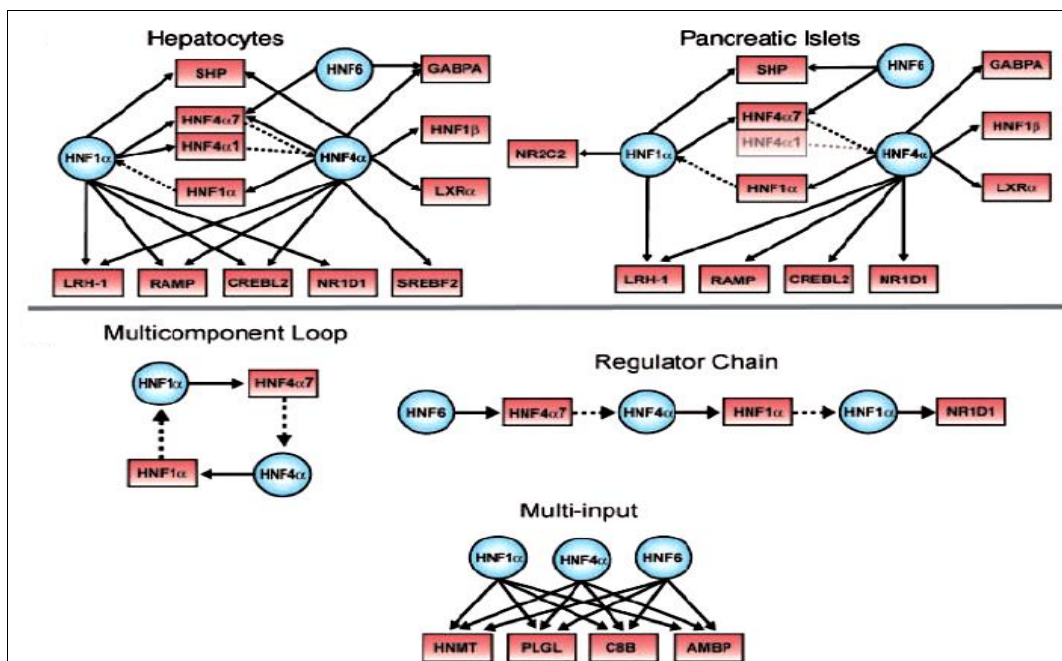


Figura 4: Redes regulatórias envolvendo o HNF 1A. Proteínas: círculos azuis. Genes alvo: retângulos vermelhos. Adaptado de Odom e col. 2004⁶².

Estudos têm indicado que a proteína HNF 1A regula a expressão do gene da insulina, assim como de proteínas codificadoras envolvidas no transporte e metabolismo da glicose. Cita-se ainda, sua importância no metabolismo mitocondrial e na adesão célula-célula⁵⁸.

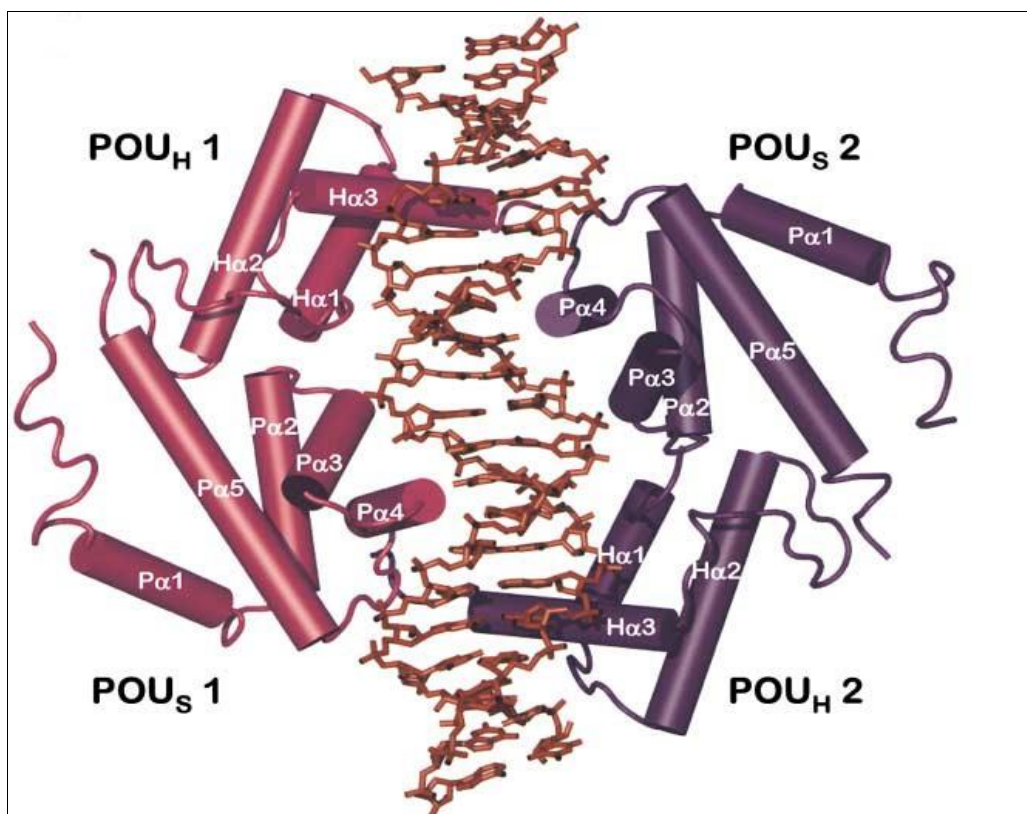


Figura 5: Estrutura do complexo HNF 1A/DNA. Duas proteínas (1 e 2) ligadas ao DNA (centro). As cinco α -hélices de cada domínio POU_S e as três α -hélices de cada domínio POU_H são marcadas como $\text{P}\alpha 1$ -5 e $\text{H}\alpha 1$ -3, respectivamente. Adaptado de Chi e col., 2002⁶¹.

2. JUSTIFICATIVA

A terapêutica intensiva para os pacientes com DM 1, proposta pelo Diabetes Control and Complication Trials (DCCT)⁶³, inclui insulino-terapia e monitorização intensiva da glicemia capilar. Isto implica em um consumo mensal de 120 fitas reagentes, totalizando um valor aproximado de R\$ 360,00, por quatro testes diários⁶⁴. Além dos gastos com as fitas, soma-se o custo das seringas descartáveis e outros materiais para desinfecção do frasco e antissepsia da pele como se preconiza na prática do preparo e aplicação de injeções⁶⁴. Songer e colaboradores⁶⁵, em 1997, ressaltam que estes gastos afetam diretamente as famílias de baixa renda, que chegam a gastar 56% a mais do que as famílias que não possuem diabéticos. Estes mesmos autores enfatizam o alto custo do manejo do diabetes, incluindo materiais e medicação, como é o caso das famílias americanas que gastam aproximadamente US\$ 2500 por ano. Esse custo é semelhante aos US\$ 2770 anuais que gastam as famílias australianas com filhos adolescentes diabéticos⁶⁶.

Ao se reconhecer o impacto dos custos com o tratamento do DM e considerando a experiência junto a pacientes com DM1, pode-se afirmar que a terapêutica intensiva é onerosa, impossibilitando o fornecimento ou a compra do número adequado de materiais e medicações utilizados diariamente pelos pacientes diabéticos, isso também refletido pela precariedade do serviço público de saúde. Dessa forma, torna-se difícil a implementação eficiente da terapêutica intensiva no manejo do diabetes, o que leva a reflexão sobre as sérias dificuldades econômicas que a clientela diabética enfrenta mensalmente, principalmente se não adquirir a medicação e os materiais em quantidade suficiente para administrar a insulina.

Como observado o DM 1, em especial, representa um importante problema de saúde, não só para o paciente, mas para toda a sociedade, pela necessidade de implantação de regras que determinem gastos prioritários e necessários a esta parcela da população.

O diagnóstico clínico, relativamente fácil de ser realizado, aponta para a necessidade da determinação exata de qual subtipo de DM o paciente é portador, pois esta definição tem repercussões óbvias na escolha correta do tratamento e também no prognóstico da doença nestes indivíduos. Assim, mostra-se a

importância não só econômica, mas social e pessoal do diagnóstico do diabetes tipo MODY na população de DM 1. Além disso, a suspeita ou confirmação de que um paciente é portador de MODY permite o diagnóstico de outros familiares que desconheciam sua condição, propiciando o emprego do tratamento mais adequado e precoce, o que certamente os protegerá do advento das complicações crônicas secundárias ao mau controle metabólico ou determinará a não necessidade de tratamento mais agressivo quando de um diagnóstico posterior. O diagnóstico genético de MODY já é feito de forma rotineira em alguns países, não o sendo no Brasil. Espera-se que em médio prazo se torne um recurso disponível em nossa região, por se tratar de um exame de extrema importância na prática da diabetologia.

Diante do exposto e avaliando-se determinadas peculiaridades de alguns pacientes atendidos no ambulatório de DM 1 do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, este trabalho se propõe a avaliar a prevalência de MODY 3 nos pacientes com características clínicas próprias.

3. Objetivos

3.1. Geral

- Investigar mutações no gene *HNF 1A* em pacientes diabéticos 1 suspeitos de MODY.

3.2. Específicos

- Identificar clinicamente os pacientes com suspeita de MODY;
- Estimar a prevalência de MODY 3 na população estudada;
- Descrever as mutações encontradas;
- Correlacionar as mutações encontradas com a idade de diagnóstico do DM;
- Correlacionar as mutações encontradas com a nefropatia e retinopatia diabética.

4. METODOLOGIA

4.1. Local de estudo

O estudo foi realizado no Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário (HUUFMA) e no Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade (LEGH), também no Hospital Universitário.

4.2. Tipo de estudo

Este estudo foi um estudo transversal genético-molecular das anomalias relacionadas ao MODY.

4.3. Casuística

O estudo foi realizado com pacientes portadores de Diabetes Mellitus do tipo 1 com características clínicas de MODY.

4.4. Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA com o registro do CEP 186/09 e processo número 004798/2009-00 (ANEXO A). A entrevista e coleta de material foram realizadas apenas após assinatura do paciente ou seu responsável do TCLE (Apêndice A), com base na portaria nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e com prévia explicação do que era a pesquisa com seus objetivos, além de serem informados todos os seus direitos e que o mesmo poderia retirar-se a qualquer momento dependendo de sua vontade.

4.5. Coleta de Dados

Os dados foram coletados com auxílio de questionário contendo características socioeconômicas e demográficas, assim como história clínica, exame físicos e exames de laboratório (ANEXO B). Após análise dos dados, os pacientes com diagnóstico clínico de MODY (ANEXO C) coletaram sangue para a realização do sequenciamento do gene *HNF 1A*.

A pressão arterial (PA) foi aferida com estetoscópio e esfigmomanômetro de mercúrio no braço esquerdo, repousado sobre uma superfície firme na altura do coração, com a paciente sentada. A paciente não poderia estar com a bexiga cheia, ter praticado exercícios físicos ou ter ingerido bebidas alcoólicas, café, alimentos até 30 minutos antes da verificação. Foi considerado hipertensão os níveis tensionais acima de 130 / 80 mmHg⁶⁷ (SBC, 2010) ou pacientes em uso de anti-hipertensivos.

Para avaliação das medidas antropométricas, como peso e estatura, utilizou-se balança antropométrica mecânica, com medidor de altura em centímetros acoplado (Filizola[®]), com capacidade máxima de 180 Kg e sensibilidade de 100g.

Os pacientes ficavam descalços de costas para a balança com os pés juntos, braços paralelos ao corpo em posição ereta e encostada no aparelho com o calcanhar, tocando a parte posterior do antropômetro e a visão formando um ângulo de 90° ao solo. Foram retirados objetos e adereços que pudessem interferir nas medidas do peso e estatura. Com as medidas do peso e estatura, calculou-se o IMC no qual o peso em quilogramas é dividido pelo quadrado da altura em metros. Após a obtenção do IMC, este foi caracterizado pela classificação proposta pela OMS (1998) e adotada pelo Ministério da Saúde: magreza (IMC < 18,5), eutrofia (IMC 18,5 a 24,9 Kg/m²), sobrepeso (IMC 25 a 29,9 Kg/m²), obesidade (IMC > 29,9 Kg/m²)⁶⁸.

A coleta sanguínea em jejum de 12 horas ocorreu no período matutino (entre sete e nove horas) para realização de hemograma, lipidograma, e glicemia jejum e perfil lipídico e sequenciamento genético. As amostras de sangue foram coletadas de veia periférica de membro superior. A coleta de urina de 24h para a medida da proteinúria, microalbuminúria e depuração de creatinina foi feita coletando-se a partir da segunda urina do dia e por todo o dia e noite, sendo colocado em recipiente estéril e posteriormente levado a geladeira.

As dosagens laboratoriais foram realizadas em um laboratório certificado pela ISO 9001:2000 sob o número SQ – 7131, pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) e pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC).

4.6. Exames realizados

Todos os pacientes realizaram os seguintes exames, pois fazem parte da investigação de rotina do DM 1: Glicemia em jejum, Peptídeo C, Insulina sérica,

Uréia, Creatinina, Hemoglobina glicada, Perfil Lipídico, TSH, Depuração de Creatinina, Proteinúria de 24 h, Microalbuminúria 24h. O Anticorpo Anti-descarboxilase de ácido glutâmico (Anti-GAD) foi realizado somente em pacientes com menos de 5 anos de doença.

4.7. Avaliação Molecular

4.7.1. Coleta do material:

Foram coletados oito ml de sangue de cada paciente com DM1 suspeito de MODY3. Logo após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3700 RPM para a retirada do anel leucocitário dos mesmos e em seguida armazenados no freezer a -20°C até o procedimento de extração de DNA.

4.7.2. Extração de DNA (Check gel de DNA):

O DNA de cada indivíduo foi extraído utilizando o kit comercial para extração de DNA genômico da marca *Biological*®, seguindo-se o protocolo do fabricante (Apêndice B). Após a extração, dois µl do produto foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% por 15 minutos a 100 Volts em seguida corado com brometo de etídio, e posteriormente visualizado no transluminador de luz ultravioleta (UV).

4.7.3. PCR (Reação de Cadeia de Polimerase)

Foi realizada a reação de PCR dos produtos obtidos pela extração de DNA, com as seguintes concentrações Tampão 1X (contendo 10mM Tris-HCL, pH 8,3 e 50mM KCL), dNTP's 10mM, MgCl₂ 1mM, Go Taq Flexi DNA Polimerase 2,5U (*Promega*), *primer* 20pmol (Invitrogen, Brasil LTDA) com volume final de 25 µl. A termociclagem foi realizada no *GenAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, USA) e consistiu de um ciclo de 95° por 5min, 35 ciclos de 94°por 1min, 60° por 45seg, 72° por 1min e um ciclo de 72°C por 7min.Os primers utilizados foram previamente descritos na literatura⁶⁹ (Tabela 2).

Tabela 3 - Sequências dos *primers* do gene *HNF1A*.

PRIMER	5'	SEQUENCIA	3'	PB
Promot1-F	ACTGTTCTTGGCACATGGTAATC			415 pb
Promot1-R	CCCTGCAAAGTGCAGGCCTCA			
Promot2-F	TCCCATCGCAGGCCATAGCTC			388 pb
Promot2-R	GCTCCGTCTGCAGCTGGCTCA			
EX1-F	TGGCAGCCGAGCCATGGTTTC			415 pb
EX1-R	GAAGGGGGGCTCGTTAGGAGC			
EX2-F	CAGCCCTTGCTGAGCAGATCC			366 pb
EX2-R	CCACTGACTTCCTTTCCATCTACC			
EX3-F	GGGCAAGGTCAGGGGAATGGA			304 pb
EX3-R	CAGCCCAGACCAAACCAGCAC			
EX4-F	CAGAACCCTCCCCTTCATGCC			360 pb
EX4-R	CCCACCTTCCCACGTGTCCC			
EX5-F	AACCAATGGAGTTTGAAGTGCTGA			321 pb
EX5-R	GCCTCCCTAGGGACTGCTCCA			
EX6-F	TGGAGCAGTCCCTAGGGAGGC			322 pb
EX6-R	GTTGCCCCATGAGCCTCCAC			
EX7-F	GGTCTTGGGCAGGGGTGGGAT			321 pb
EX7-R	CTGCAATGCCTGCCAGGCACC			
EX8-F	GAGGCCTGGGACTAGGGCTGC			229 pb
EX8-R	CTCTGTGACAGGCCAAGGGAG			
EX9-F	CCTGTGACAGAGCCCCTCACC			318 pb
EX9-R	TAGGCCTGCTGCATGCACAGC			
EX10-F	GTACCCCTAGGGACAGGCAGG			248 pb
EX10-R	ACCCCCAAGCAGGCAGTACA			

p.b: pares de base, EX: éxon, F: forward R: reverse

4.7.4. Eletroforese do produto de PCR

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% por uma hora e meia a 120 Volts em seguida corados no brometo de etídio por vinte minutos e visualizados em um sistema de fotodocumentação (*Vilber Lourmat, France*). Utilizou-se um marcador de 100 pb (Axygen ®) para auxiliar na identificação dos fragmentos de cada éxon.

4.7.5. Purificação do produto de PCR

Após a eletroforese, o produto de PCR foi purificado, conforme o protocolo (Apêndice C), a partir do kit *AccuPrep® Purification Kit* (Bionner Corporation), obtendo-se um volume final de 30 µl de solução.

4.7.6. Sequenciamento automático

As amostras purificadas foram submetidas ao sequenciamento automático utilizando-se o equipamento ABI 3100 com capilares POP6 (POP-6TM polymer – Applied Biosystems), e o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V3.1®*. Para o processo de sequenciamento fez-se necessário a realização das seguintes etapas:

✓ PCR Big Dye (V3. 1 – Z): realizada de acordo com o protocolo (Tabela 4). Para a reação de sequenciamento foram utilizados aproximadamente 100 ng de DNA, 3,2 pmol de *primers* (sense e antisense) e 6µL de água ultra pura até completar o volume de 10 µL. A termociclagem foi realizada no *GenAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, USA) e consistiu de um ciclo de 94° por 1min, com 35 ciclos de 96°por 15seg, 50°por 15seg, 60° por 1min e extensão final de 4°C por 1min.

Tabela 4: Protocolo Pgem (controle positivo da corrida):

REAGENTES	QUANTIDADE
Big Dye	2, 0µl
Pgem	1, 0 µl
Primer	0, 5 µl
H2O	6, 0 µl

✓ Precipitação com isopropanol/etanol: Processo importante para eliminar os sais, dNTP e ddNTP que possam ter ficado da reação anterior.

✓ Ressuspensão com Formamida Hi-Di (Applied Biosystems).

✓ Cada éxon foi sequenciado na direção forward (5' - 3') e reverse (3' - 5'). A sequência dos éxons foi comparada com a sequência publicada em literatura¹⁸, utilizando-se o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A análise dos dados foi realizada através do programa de alinhamento *SeqScape 2.x*® (ABI PRISM).

4.8. Programas de Presunção de Patogenicidade das Mutações

O estudo do comportamento teórico das mutações *missenses* no gene *HNF 1A* foi realizado com a utilização de programas de informática chamados: SIFT, Polyphen, PMUT, Align-GVGD.

4.8.1. PMUT (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>)

É um programa que prediz se uma mutação pode ser patogênica ou neutra. Baseia-se nas características das sequências e em um software de uma ou duas redes neurais NN (rede neural) que usa base de dados internas, predição de estrutura secundária e conservação dessa sequência. Dá uma resposta afirmativa ou negativa e um índice de confiança⁷⁰.

Coloca-se a sequência protéica estudada em formato FASTA junto com o aminoácido e a posição alterada que foi produzida. Os resultados mostrados variam de zero a um, onde o valor zero indica que a mutação é neutral, não patogênica e os valores mais altos são patogênicos. Além disso, o programa dá o índice de confiança, em que os valores ficam entre zero (pouco confiável) e nove (muito confiável), cujo significado é se uma mutação for patogênica e tem um valor de confiança nove, sugere esta mutação seja realmente patogênica. Também mostra a mutação em relação à estrutura protéica. A taxa de erro para falso positivo é de 21% e para falso negativo é de 17%. Caso se inclua a estrutura da proteína, a taxa de falso positivo se reduz para 12% e de falso negativo para 10%.

4.8.2. POLYPHEN :(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>)

Este programa prediz o possível impacto de uma substituição de um aminoácido sobre a estrutura e função da proteína humana aplicando características físicas diretas e comparativas⁷¹. Esta predição é baseada em número de características que informam a sequência, a estrutura poligênica das substituições.

A sequência da proteína é colocada no programa em formato FASTA. O programa faz o alinhamento desta sequência com proteínas homólogas de espécies descritas em BLAST. O resultado do alinhamento múltiplo é usado pelo software PSIC (Posição específica de contagens independente) para calcular o perfil da matriz. Os elementos da matriz são proporções logarítmicas indicando a probabilidade de que uma determinada posição (taxa de fundo). O programa Polyphen analisa os valores absolutos da diferença entre os valores do perfil das duas variantes alélicas na posição polimórfica. Um valor muito elevado desta diferença pode indicar que a substituição estudada aparece pouco ou nada em uma família de proteínas. Polyphen também mostra o número de sequências alinhadas na posição estudada. Este número indica a credibilidade dos cálculos do valor do perfil. Os resultados do estudo podem determinar que a alteração é:

- provavelmente patogênica: uma alta probabilidade de afetar a estrutura ou função da proteína;
- eventualmente patogênica: acredita-se que poderia afetar a função ou a estrutura da proteína;
- benigna: é provável não ter qualquer efeito fenotípico;
- desconhecido: em alguns casos, a falta de dados não permite a programa para fazer uma previsão.

4.9. Determinação das complicações crônicas

1. Nefropatia diabética: foram considerados nefropatas aqueles pacientes que apresentavam valores de microalbuminúria de 24h > 30 mg/24h ou proteinúria > 140 mg/24h.

2. Retinopatia diabética: avaliado pelo mapeamento da retina e classificado como possuindo ou não a retinopatia.

3. Neuropatia diabética: avaliado pela investigação clínica de sintomas típicos como parestesia, anestesia, dor em queimação de membros inferiores, hipoglicemia sem sinais e sintomas típicos, episódios de diarreia alternados com constipação. sendo descartado qualquer outra patologia. Caso o paciente apresentasse o sintoma era classificado como sendo portador da neuropatia periférica.

4. Vasculopatia diabética:

- a. Coronariopatia: sinais ou sintomas típicos ou avaliação cardiológica mostrando tais alterações ou história prévia de coronariopatia.
- b. Periférica: sinais e sintomas típicos de insuficiência vascular periférica.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização clínica dos pacientes com suspeita de MODY

Neste trabalho foram avaliados 60 pacientes com diagnóstico de DM 1 prévio, dentre estes, 20 foram investigados com suspeita de MODY 3 (33,8%). Onze pacientes do sexo feminino e nove do sexo masculino. Apresentavam uma média de idade de $33,3 \pm 8,1$ anos e que ao diagnóstico do DM tinham média de $24,35 \pm 6,91$ anos de idade. Estes pacientes tinham tempo médio de doença de $9,25 \pm 6,37$ anos. Vinte e cinco por cento eram hipertensos e 45% dislipidêmicos. A dose total de insulina diária usada por estes pacientes foi $0,58 \pm 0,31$ UI/kg. Trinta e três por cento faziam uso de Metformina como droga coadjuvante em seu tratamento (Tabela 5).

Tabela 5. Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes com diagnóstico clínico de MODY. São Luís, Maranhão, 2011.

Varíaveis	N = 20
Sexo (f/m)	11/09
Idade atual (anos)	$33,6 \pm 8,1$
Idade do diagnóstico (anos)	$24,35 \pm 6,91$
Tempo de doença (anos)	$9,25 \pm 6,37$
IMC (Kg/m^2)	$24,76 \pm 4,77$
CA(f/m) (cm)	$87,5 \pm 11,91 / 88,11 \pm 9,39$
Glicemia em jejum (mg/dl)	$116,9 \pm 38,48$
Hemoglobina Glicada (%)	$6,98 \pm 1,45$
Dose total de insulina (UI/Kg)	$0,583 \pm 0,31$
Metformina	7/20
PAS (mmHg)	117 ± 15
PAD (mmHg)	$78,4 \pm 11,4$
HAS (%)	5/20 (25%)
Dislipidemia (%)	9/20 (45%)

f: feminino m: masculino kg/m^2 : quilograma/metro quadrado cm: centímetro
mg/dl: miligrama/decilitro UI/kg: unidades internacionais por quilo mmHg:
milímetro de mercúrio %: percentagem

Dentre as complicações crônicas apresentadas pelos pacientes tem-se: 25% de retinopatia, 55% de nefropatia, 35% de neuropatia periférica sintomática e 15% de cardiopatia isquêmica (Tabela 6).

Tabela 6: Complicações apresentadas pelos pacientes com diagnóstico clínico de MODY. São Luís, Maranhão, 2011

Complicações Crônicas	Frequência
Retinopatia	5/20 (25%)
Nefropatia	11/20 (55%)
Neuropatia	7/20 (35%)
Cardiopatía isquêmica	3/20 (15%)

%; percentagem

Dentre estes pacientes, somente um não apresentou qualquer mutação no gene HNF 1A. Então, 95% dos pacientes submetidos à avaliação molecular tinham alguma alteração no gene HNF 1A e na população estudada de DM 1, estima-se que 31,6% dos pacientes apresentam alguma mutação neste gene, podendo ser causa de MODY 3.

5.2. Descrição de mutações encontradas

Foram encontradas 53 variações, destas uma na região promotora (uma deleção). Das 52 variações que ocorreram nos éxons, 15 eram silenciosas. Entre as não-silenciosas, observaram-se 29 *missenses*, sete deleções e uma *nonsense* (Tabelas 7 e 8).

Quando estas mutações não-silenciosas são distribuídas nas diferentes isoformas do gene observa-se que 11 mutações encontram-se na isoforma A, duas na isoforma AB e 24 na isoforma ABC. Transferindo-se essas mesmas mutações para os domínios da proteína observaram-se: uma mutação *missense* no domínio de dimerização, 09 mutações (duas deleções e sete *missenses*) no domínio de ligação do DNA e 26 mutações (três deleções, uma *nonsense* e 23 *missenses*) no domínio de transativação (Figura 8). Importante observar que uma paciente apresentou uma deleção na posição A39, produzindo uma alteração completa da proteína e possivelmente gerando uma proteína truncada (Fig.9).

O maior número de alterações foi encontrado no éxon 06 (no total de 11 *missense* e cinco silenciosas), no éxon 03 não houve nenhuma alteração e no éxon 05 ocorreram apenas três alterações (duas silenciosas e uma *missense*).

Na região do promotor foi encontrada uma deleção (-119delG) nos pacientes AG11 e AG19, com a deleção de uma guanina. No éxon 01, no paciente AG03, foi encontrada uma deleção de uma citosina no nucleotídeo 117 (A39fsDelC) (Figura 7).

No éxon 02, foram encontradas três deleções de guaninas nos seguintes nucleotídeos: no paciente AG08, no nucleotídeo 471 (Q157fsDelG) (Figura 8), no paciente AG15, no nucleotídeo 477 (Q159fsDelG) e nos pacientes AG03 e AG08, no nucleotídeo 516 (E172fsDelG) (Figura 9).

No éxon 06 foram encontradas duas deleções. Uma no paciente AG13, no nucleotídeo 1170, com a deleção de uma guanina (E390fsDelG) e outra no paciente AG14, no nucleotídeo 1173, com a deleção, também, de uma guanina (Q391fsDelG) (Figuras 10 e 11, respectivamente).

Foram encontradas 15 mutações silenciosas que se encontram na tabela 5. Todas as outras alterações, com seus respectivos domínios de proteína e seus tipos, encontram-se na tabela 6.

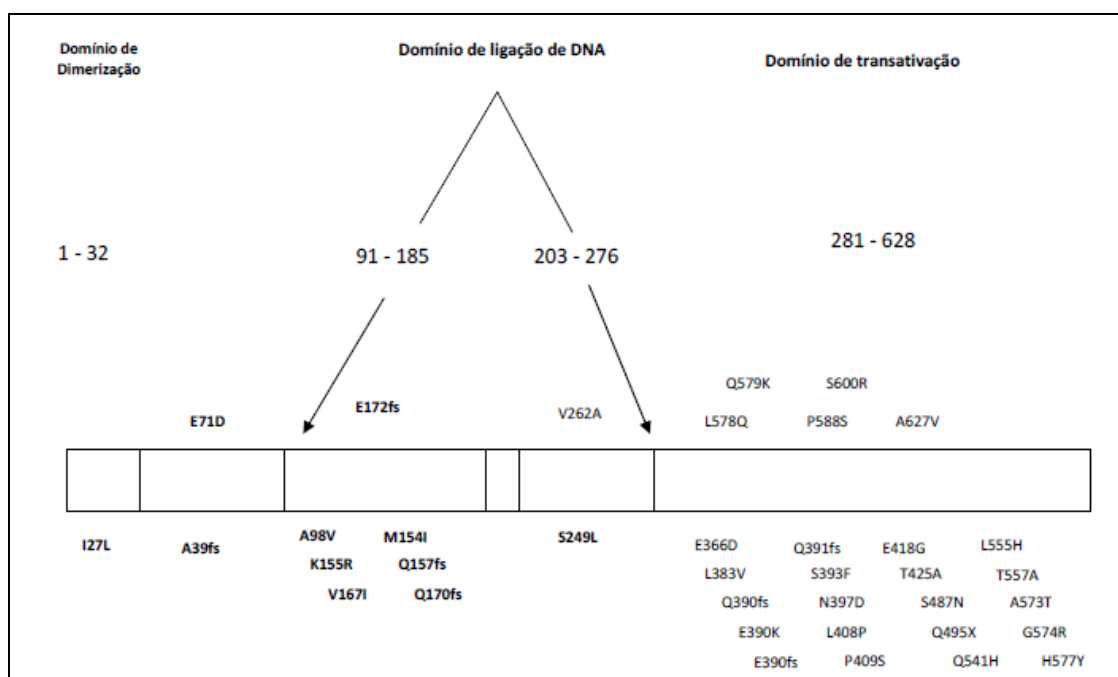


Figura 6: Representação da estrutura da proteína HNF 1A por domínios funcionais assim como as mutações encontradas.

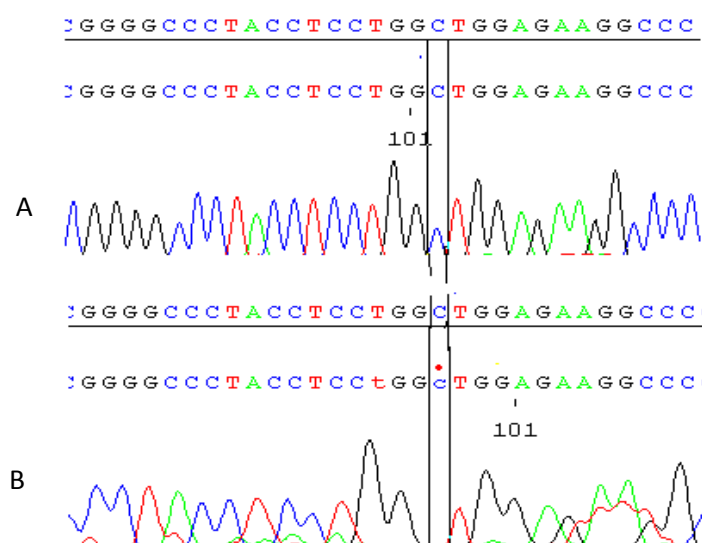


Figura 7: Eletroferograma mostrando a deleção A39fsdelC, no paciente AG03.

A: sequência normal B: sequência do paciente.

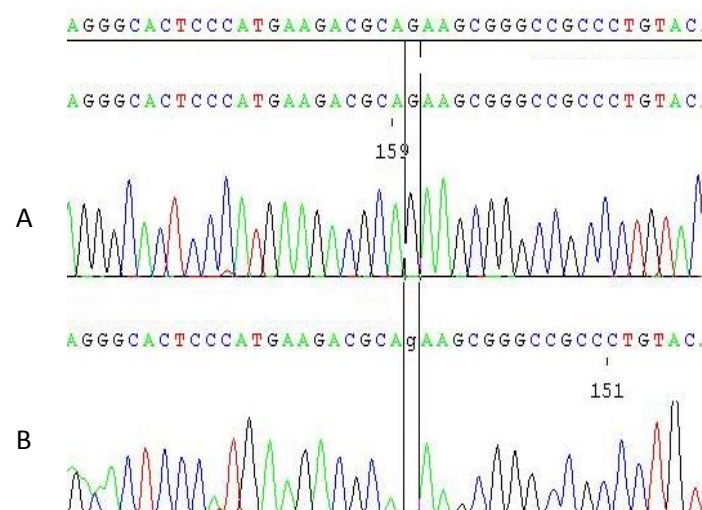


Figura 8: Eletroferograma mostrando a deleção Q157fsDelG, no paciente AG08

A: sequência normal B: sequência do paciente.

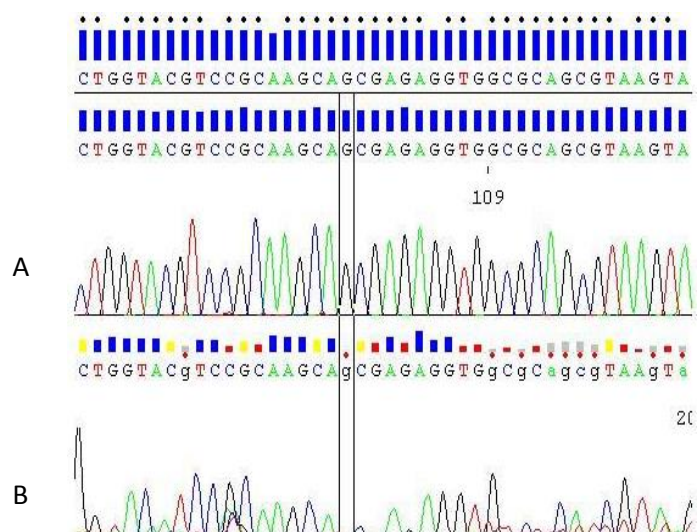


Figura 9: Eletroferograma mostrando a deleção V172fsDelG, no paciente AG03.

A: sequência normal B: sequência do paciente.

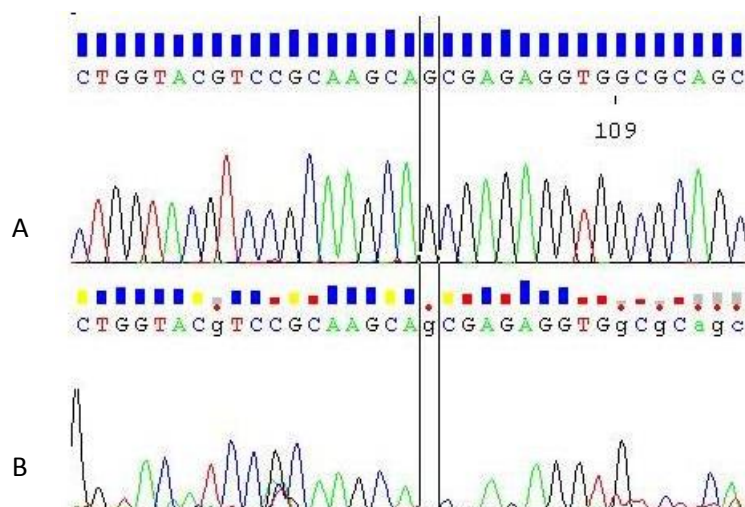


Figura 10: Eletroferograma mostrando a deleção E390fsDelG, no paciente AG13

A: sequência normal B: sequência do paciente.

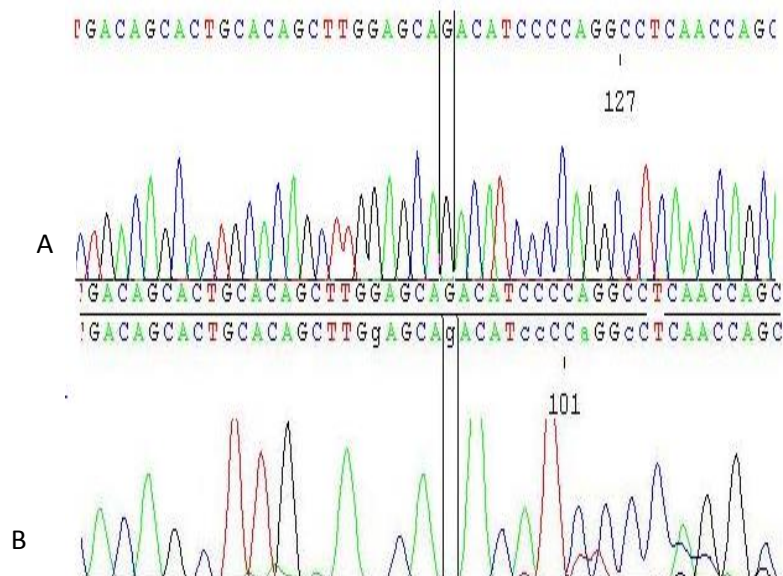


Figura 11: Eletroferograma mostrado a deleção E391fsDelG, no paciente AG14.

A: sequência normal B: sequência do paciente.

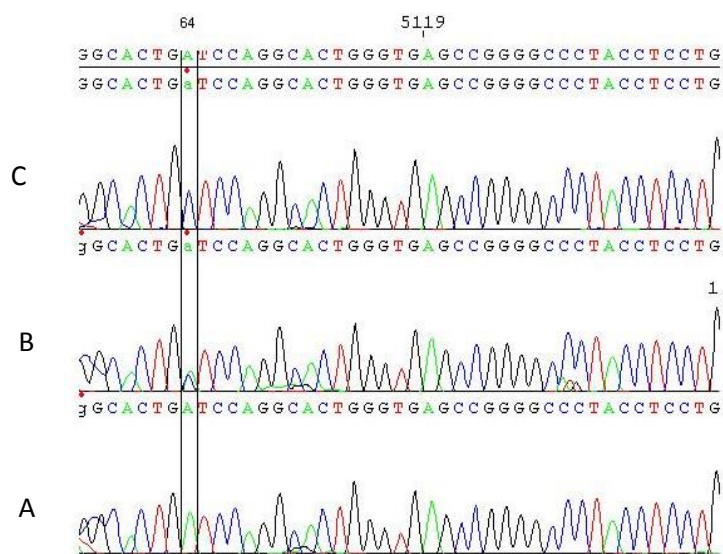


Figura 12: Eletroferograma mostrando a mutação *missense* I27L, localizada no éxon 01, nos seguintes pacientes AG11 e AG14. A: sequência normal B: paciente AG11 C: paciente AG14.

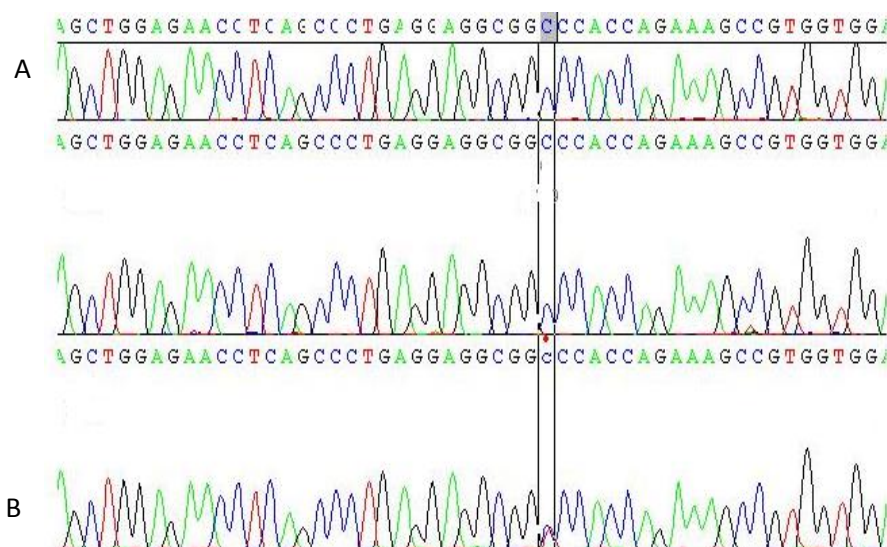


Figura 13: Eletroferograma mostrando a mutação *missense* A98V, localizada no éxon 01, no paciente AG15. A: sequência normal B: sequência do paciente.

Tabela 7: Variações gênicas encontradas no gene *HNF 1A* dos pacientes em investigação de MODY. São Luís, Maranhão, 2011.

Ex	Códon	cDNA	Alteração do nucleotídeo	Proteína	Posição relativa ao domínio
1	27	c.79A>C	ATC-CTC	p.ILe27Leu I27L	Dimerização
	39	c.116delC	GCT – GTG	p.A39fs A39fsdelC	-
	71	c.213G>T	GAG – GAT	p.Glu71Asp E71D	-
	98	c.293C>T	GCC – GTC	p.Ala98Val A98V	Ligação
2	154	c.462G>A	ATG – ATA	p.Met154Ile M154I	Ligação
	155	c.464A>G	AAG – AGG	p.Lys155Arg K155R	Ligação
	157	c.471delG	CAG – CAA	p.Q157fs Q157fsdelG	Ligação
	167	c.499G>A	GTC – ATC	p.Val167Ile V167I	Ligação
	170	c.510delG	CAG – CAC	p.Gln170fs Q170fsdelG	Ligação
	172	c.516delG	GAG – GTG GAG – TGG	p.Glu172fs E172fsdelG	Ligação
4	249	c.747C>T	TCA – TTA	p.Ser249Leu S249L	Ligação
	262	c.786T<C	GTG – GCG	p.Val262Ala V262A	Ligação
5	366	c.1098A>T	GAA-GAT	p.Glu366Asp E366D	Transativação
6	383	c.1147C>G	CTG – ATG	p.Leu383Val L383V	Transativação
	390	c.1170delG	GAG – CAG GAC – AGA	p.Q390fs Q390fsdelG	Transativação
	390	c.1168G>C	GAG – GAC	p.Glu390Lys E390K	Transativação
	390	c.1168delG	GAG – CAG AGC – AGA	p.Glu390fs E390fsdelG	Transativação

continua

Tabela 7: Variações gênicas encontradas no gene *HNF 1A* dos pacientes em investigação de MODY. São Luís, Maranhão, 2011. Continuação

Ex	Códon	cDNA	Alteração do nucleotídeo	Proteína	Posição relativa ao domínio
	391	c.1173delG	TTG – GAG TTG – AGC	p.Gln391fs 391QfsdelG	Transativação
	393	c.1178C>T	TCC – TTC	p.Ser393Phe S393F	Transativação
	397	c.1189A>T	AAC - GAC	Asn397Asp N397D	Transativação
	408	c.1223T>C	CTT-CCT	p.Leu408Pro L408P	Transativação
	409	c.1225C>T	CCT-TCT	p.Pro409Ser P409S	Transativação
	418	c.1253A>G	GAG-GGG	p.Glu418Gly E418G	Transativação
	425	c.1273A>G	ACG-GCG	Thr425Ala T425A	Transativação
7	487	c.1460G>A	AGC – AAC	p.Ser487Asn S487N	Transativação
	495	c.1483C>T	CAG – TAG	p.Gln495X Q495X	Transativação
8	541	c.1623G>T	CAG- CAT	p.Gln541His Q541H	Transativação
9	555	c.1665T>A	CTT – CAT	p.Leu555H L555H	Transativação
	557	c.1671A>G	ACG – GCG	p.Thr557Ala T557A	Transativação
	573	c.1719G>A	GCC – ACC	p.Ala573Thre A573T	Transativação
	574	c.1722G>A	GGG – AGG	p.Gly574Arg G574R	Transativação
	577	c.1731C>T	CAC – CAT	p.His577Tyr H577Y	Transativação
	578	c.1733T>A	CTG – CAG	p.Leu578Gln L578Q	Transativação
	579	c.1735C>A	CAG – AAG	p.Gln579Lys Q579K	Transativação

continua

Tabela 7: Variações gênicas encontradas no gene *HNF 1A* dos pacientes em investigação de MODY. São Luís, Maranhão, 2011. Continuação

Ex	Códon	cDNA	Alteração do nucleotídeo	Proteína	Posição relativa ao domínio
	588	c.1764C>T	CCC – CCT	p.Pro588Ser P588S	Transativação
10	600	c.1801C>A	AGC – AGA	p.Ser600Arg S600R	Transativação
	627	c.1880C>T	GCC – GCA	p.Ala627Val A627V	Transativação
P 1	4680- delG			-119delG	

Tabela 8: Mutações silenciosas encontradas no gene *HNF 1A* dos pacientes em investigação de MODY. São Luis, Maranhão 2011.

Exon	Códon	cDNA		Proteína	Domínio
1	17	c. 51C>A	CTC – CTA	p.Leu17=	Dimerização
4	262	c.786G>T	GTG – GTT	P.Val262=	Transativação
	288	c.864G>C	GGG - GGC	p.Gly288=	Transativação
5	333	c.999A>C	GTA – GTC	p.Val333=	Transativação
	363	c.1089G>A	CTG – CTA	p.Leu363=	Transativação
6	390	c.1170G>A	GAG - GAA	p.Glu390=	Transativação
	400	c.1200T>C	CCT – CCC	p.Pro400=	Transativação
	403	c.1209C>T	CTC – CTT	p.Leu403=	Transativação
	404	c.1211C>A	ATC – ATA	p.Ile404=	Transativação
	426	c.1278C>T	TTC-TTC	p.Phe426=	Transativação
7	459	c.1375C>T	CTG – CTA	p.Leu459=	Transativação
	489	c.1467C>T	TTC – TTT	p.Phef489=	Transativação
8	515	c.1545G>A	ACG – ACA	p.Thr515=	Transativação
9	555	c.1667T>A	CTT – CTA	p.Leu555=	Transativação
	593	c.1766C>G	CCC – CCG	p.Pro593=	Transativação

Tabela 9: Classificação das mutações conforme a análise de programas de informática

Mutações	Polyphen 2	AlignGVGD	PMUT
E71D	Benigna	Não Deleteria	Neutra
I27L	Benigna	Não Deleteria	Neutra
A98V	Benigna	Deleteria	Patogênica
M154I	Benigna	Não Deleteria	Neutra
K155R	Provavelmente Danoso	Não Deleteria	Neutra
V167I	Provavelmente Danoso	Não Deleteria	Neutra
S249L	Possivelmente Danosa	Deleteria	Patogênica
V262A	Possivelmente Danosa	Deleteria	Neutra
E366D	Benigna	Não Deleteria	Neutra
L383V	Provavelmente Danosa	Não Deleteria	Patogênica
E390K	Possivelmente Danosa	Não Deleteria	Neutra
S393F	Possivelmente Danosa	Deleteria	Patogênica
N397D	Benigna	Não Deleteria	Neutra
L408P	Benigna	Deleteria	Patogênica
P409S	Benigna	Não Deleteria	Neutra
E418G	Provavelmente Danosa	Deleteria	Patogênica
T425A	Benigna	Deleteria	Patogênica
S487N	Benigna	Não Deleteria	Patogênica
Q541H	Provavelmente Danosa	Não Deleteria	Patogênica
T557A	Benigna	Deleteria	Neutra
H556N	Provavelmente Danosa	Deleteria	Neutra
A573T	Benigna	Deleteria	Neutra

Tabela 9: Classificação das mutações conforme a análise de programas de informática (continuação)

Mutações	Polyphen 2	AlignGVGD	PMUT
G574R	Possivelmente Danosa	Deleteria	Patogênica
H577Y	Benigna	Deleteria	Patogênica
L578Q	Possivelmente Danosa	Deleteria	Patogênica
Q579K	Possivelmente Danosa	Deletéria	Patogênica
P588S	Provavelmente Danosa	Deleteria	Patogênica
S600R	Benigna	Deleteria	Patogênica
A627V	Provavelmente Danosa	Deleteria	Patogênica

5.3. Correlação das mutações encontradas nos seus respectivos domínios de proteína com a idade de diagnóstico, o tempo de doença, dose total de insulina usada pelo paciente, hemoglobina glicada, depuração de creatinina e proteinúria de 24h.

Para se investigar se havia qualquer relação entre a idade de diagnóstico dos pacientes, o tempo de doença, a dose total de insulina usada pelo paciente, a hemoglobina glicada, a depuração de creatinina e a proteinúria de 24 h com o domínio em que estava localizada a mutação aplicou-se a análise de variância multivariada (MANOVA) com $F_{(22,2)} = 0,5762$; $p = 0,800410$ (Figuras 14, 15, 16, 17, 18).

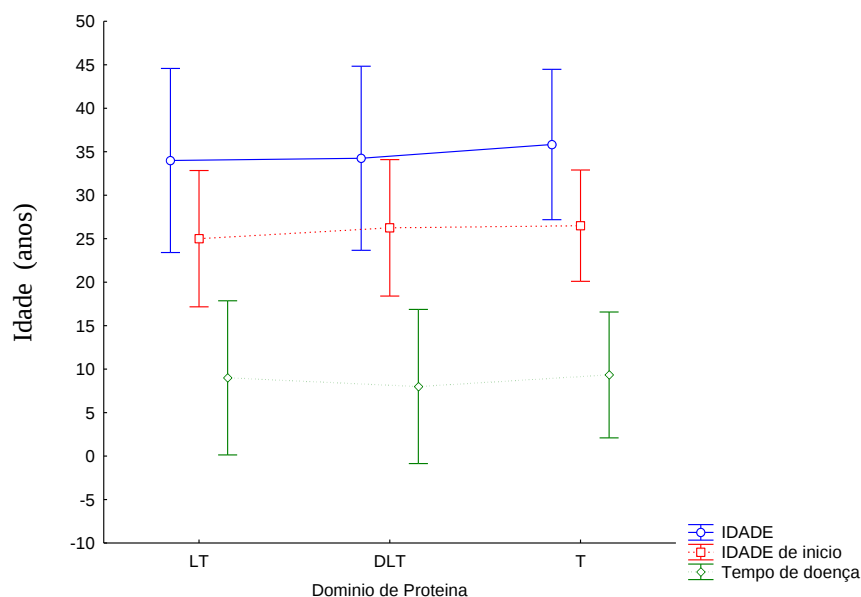


Figura 14: Comparação entre as médias de idade atual, idade de início e tempo de diabetes para os diferentes grupos de domínio de proteína. Onde: LT = Pacientes com mutação no domínio de ligação e transativação do DNA; DLT = Pacientes com mutação no domínio de dimerização, ligação e transativação do DNA; T = Pacientes com mutação no domínio de transativação do DNA.

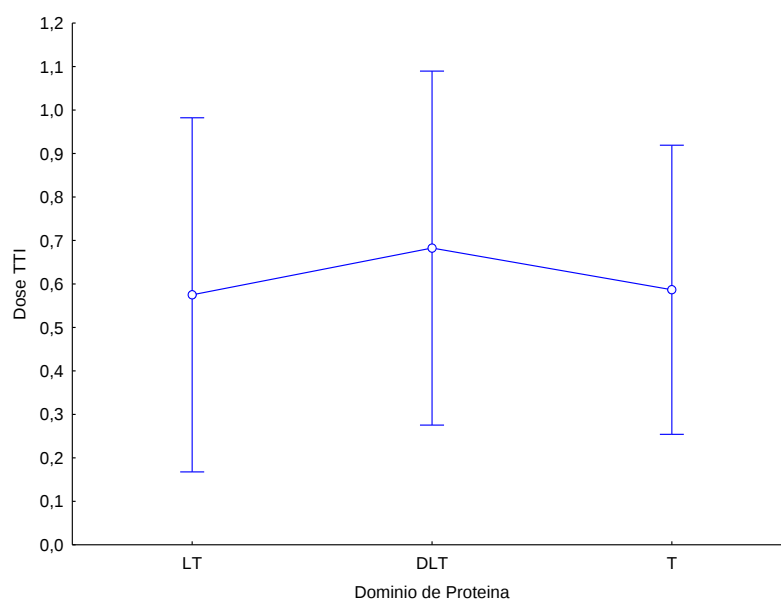


Figura 15: Comparação entre as médias de dose total de insulina por quilograma de peso (Dose TTI-UI/kg/dia) para os diferentes grupos de domínio de proteína. Onde: LT = Pacientes com mutação na região de ligação e transativação do DNA; DLT = Pacientes com mutação na região de dimerização, ligação e transativação do DNA; T = Pacientes com mutação na região de transativação do DNA.

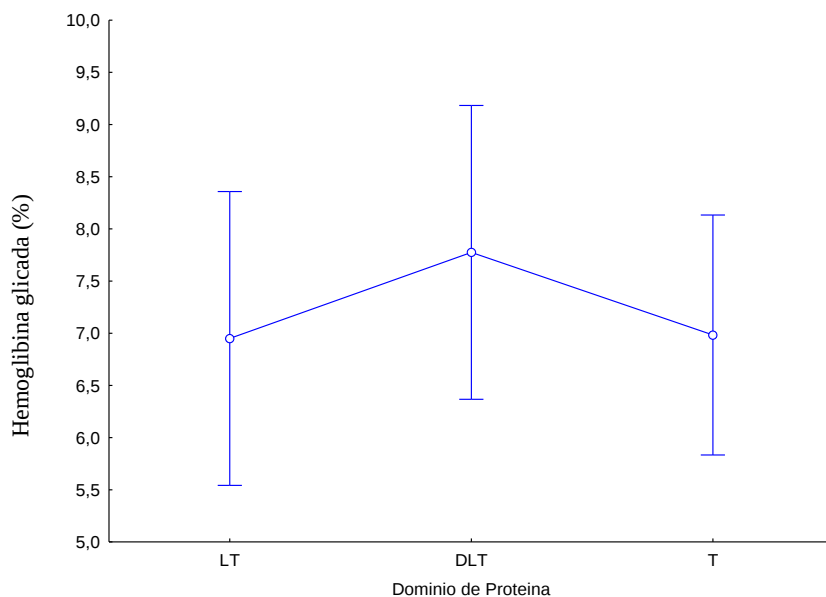


Figura 16: Comparação entre as médias de hemoglobina glicada (Hb glicada) para os diferentes grupos de domínio de proteína. Onde: LT = Pacientes com mutação na região de ligação e transativação do DNA; DLT = Pacientes com mutação na região de dimerização, ligação e transativação do DNA; T = Pacientes com mutação na região de transativação do DNA.

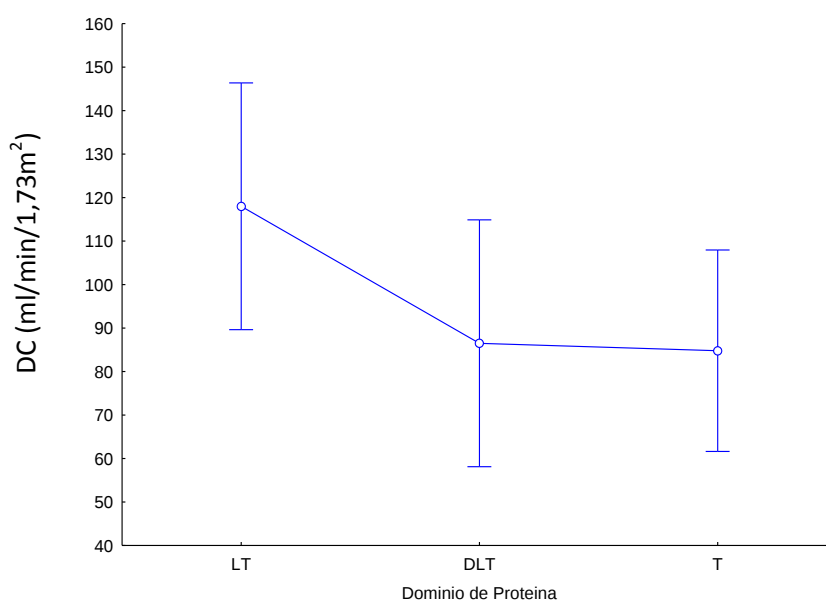


Figura 17: Comparação entre as médias de depuração de creatina (DC) para os diferentes grupos de domínio de proteína. Onde: LT = Pacientes com mutação na região de ligação e transativação do DNA; DLT = Pacientes com mutação na região de dimerização, ligação e transativação do DNA; T = Pacientes com mutação na região de transativação do DNA.

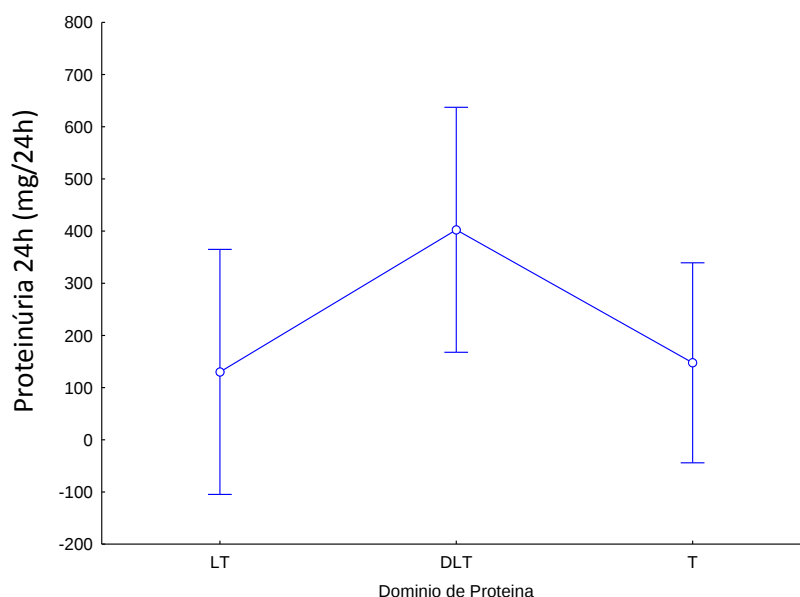


Figura 18: Comparação entre as médias de dose de proteinúria para os diferentes grupos de domínio de proteína. Onde: LT = Pacientes com mutação na região de ligação e transativação do DNA; DLT = Pacientes com mutação na região de dimerização, ligação e transativação do DNA; T = Pacientes com mutação na região de transativação do DNA.

Com esta avaliação observou-se que não houve diferença significativa entre a localização das mutações nos domínios da proteína com as variáveis estudadas ($p > 0,05$). Assim podemos inferir que os domínios de proteína apresentam a mesma importância para a idade de início do DM, assim como para o melhor ou pior controle da glicemia, avaliados pela hemoglobina glicada, proteinúria e depuração de creatinina. Assim, a estrutura total da proteína precisa estar inalterada para que exista uma perfeita harmonia no desenvolvimento destas vias metabólicas.

5.4. Correlação dos agrupamentos de mutação (MM e MFM) em seus respectivos domínios de proteína com a idade de diagnóstico, o tempo de doença, dose total de insulina usada pelo paciente, hemoglobina glicada, depuração de creatinina e proteinúria de 24h.

Para se investigar se havia qualquer relação entre a idade de diagnóstico, a idade atual dos pacientes, o tempo de doença, a dose total de insulina usada pelo paciente, a hemoglobina glicada, a depuração de creatinina e a proteinúria de 24 h com o domínio em que estava localizada a mutação aplicou-se a análise de

variância fatorial (ANOVA Fatorial) com $F_{(2, 8)} = 5,7652$; $p = 0,02815$ e se observou que apenas a hemoglobina glicada apresentou diferença estatística em função do tipo de mutação e o domínio da proteína onde está a mutação ($p < 0,05$), assim, os indivíduos com mutação frameshift e *missense* no domínio de transativação apresentaram pior controle metabólico que aqueles com mutações do mesmo tipo ou só *missense* nos outros domínios (Figura 19). O mesmo não foi observado quando analisado as outras variáveis.

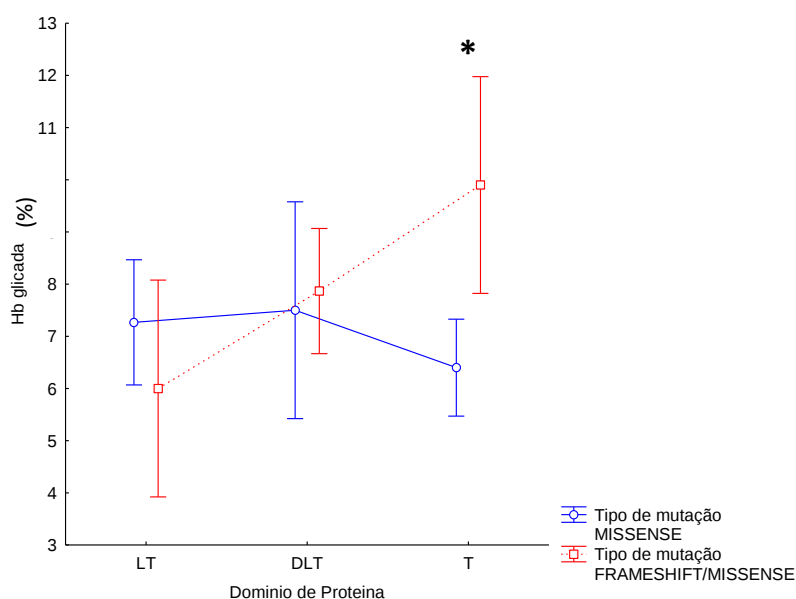


Figura 19: Efeito de Interação entre as médias da hemoglobina glicada com as mutações dos tipos “Missense” e “Frameshift/Missense” para os diferentes grupos de domínio de proteína. Onde: LT = Grupo de pacientes com mutação no domínio de ligação e transativação do DNA; DLT = Grupo de pacientes com mutação no domínio de dimerização, ligação e transativação do DNA; T = Grupo de pacientes com mutação no domínio de transativação do DNA.

Não foi feito para a mutação *nonsense* porque apenas 03 pacientes apresentaram esta mutação e quando se fazia a corrida pra formação da proteína apenas uma chegou ao códon de parada antes das deleções.

5.5. Correlação do tipo de mutação com as complicações crônicas.

Em relação aos tipos de mutação não se observou qualquer diferença estatística entre estas e o surgimento das complicações crônicas quando avaliado pelo Qui-quadrado com correção de Yates, usando-se o nível de significância para todas as análises $< 0,05$ (Tabela 10).

Tabela 10: Correlação entre o tipo de mutação com as complicações crônicas em pacientes com mutações no gene *HNF 1A* em São Luís, Maranhão, 2011.

		Tipos de mutação		P
Complicações		Missense	Missense/Frameshift	
Nefropatia	Sim	2	2	NS
	Não	7	3	NS
Neuropatia	Sim	2	1	NS
	Não	7	4	NS
Retinopatia	Sim	1	3	NS
	Não	8	2	NS

NS: não significante

De acordo com o valor de p encontrado ($p > 0,05$), não houve diferença significativa entre a frequência dos tipos de mutação e as complicações crônicas nos pacientes com mutações no gene *HNF 1A*.

5.6. Correlação do tipo de mutação e seus respectivos domínios de proteína com as complicações crônicas

Em relação aos tipos de mutação e seus respectivos domínios de proteína não se observou qualquer diferença estatística entre estas e o surgimento das complicações crônicas quando avaliado pelo Qui-quadrado com correção de Yates, usando-se o nível de significância para todas as análises $< 0,05$ (Tabela 11).

Tabela 11: Correlação entre o tipo de mutação com seus respectivos domínios de proteína com as complicações crônicas em pacientes com mutações no gene *HNF 1A* em São Luís, Maranhão, 2011.

Complicações		Domínio de Proteína			P
		T	LT	DLT	
Nefropatia	Sim	2	-	2	NS
	Não	4	4	2	NS
Neuropatia	Sim	2	-	1	NS
	Não	4	4	3	NS
Retinopatia	Sim	1	-	3	NS
	Não	5	4	1	NS

Onde: T = Transativação; LT = Ligação de DNA + Transativação; DLT = Dimerização + Ligação de DNA + Transativação.

De acordo com o valor de p encontrado ($p > 0,05$), não houve diferença significativa entre a frequência de mutações nos domínios de proteína e as complicações crônicas nos pacientes com mutações no gene *HNF 1A*.

5.7. Avaliação da correlação entre as mutações exônicas e idade de diagnóstico, hemoglobina glicada, proteinúria de 24h e depuração de creatinina.

Realizando-se a correlação linear de Pearson com o objetivo de verificar se há correlação estatística entre as mutações exônicas e a idade de início do DM, assim como a hemoglobina glicada, depuração de creatinina e proteinúria de 24 h, usando-se nível de significância igual a 0,05, observou-se que não houve essa correlação entre as variáveis analisadas (Figuras 20, 21 e 22)

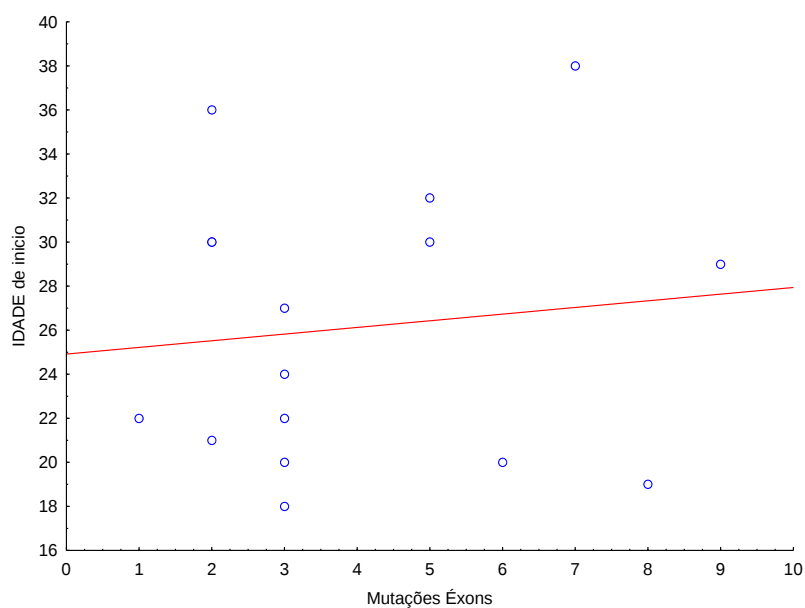


Figura 20: Gráfico da correlação linear de Pearson das mutações exônicas com a idade de início do DM em pacientes com mutações no gene *HNF 1A*.

Conotação do teste: $r^2 = 0,0135$; $r = 0,1160$; $p = 0,6687$

Onde: r^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente linear de Pearson; p = probabilidade do teste.

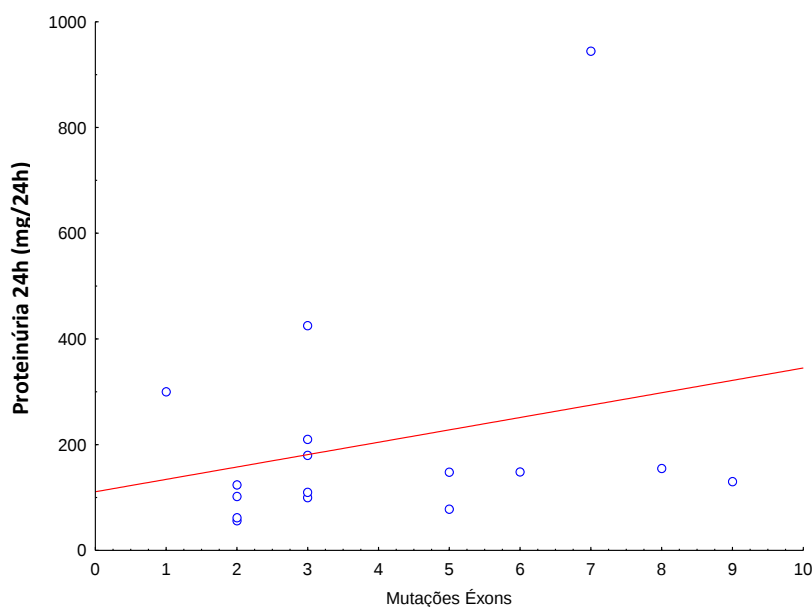


Figura 21: Gráfico da correlação linear de Pearson das mutações exônicas com a proteinúria de 24h.

Conotação do teste: $r^2 = 0,0659$; $r = 0,2567$; $p = 0,3373$

Onde: r^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente linear de Pearson; p = probabilidade do teste

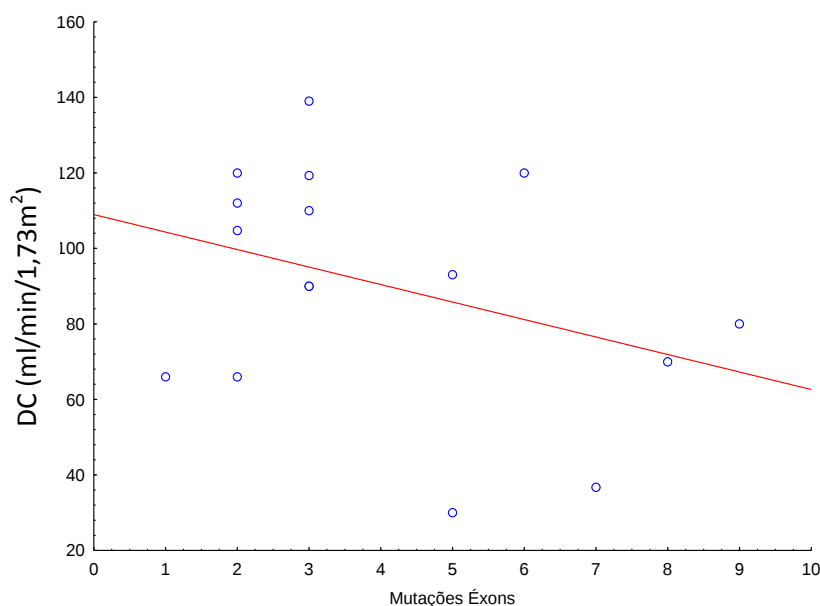


Figura 22: Gráfico da correlação linear de Pearson das mutações exônicas com a depuração de creatinina em pacientes com mutações no gene *HNF 1A*.

Conotação do teste: $r^2 = 0,1295$; $r = -0,3599$; $p = 0,1709$

Onde: r^2 = coeficiente de determinação; r = coeficiente linear de Pearson; p = probabilidade do teste.

5.8. Alinhamento da proteína HNF 1A normal com as supostas proteínas mutadas

Ao se realizar o alinhamento da proteína normal com as mutadas, observa-se que os pacientes com mutações frameshift finalizam precocemente as respectivas proteínas. Então, verificou-se uma paciente que teve uma mutação no aminoácido 39 e terminou a proteína com 121 aminoácidos. Da mesma forma se observou um paciente que terminou a proteína com 179 aminoácidos, outro com 411 aminoácidos, outro com 416 e outros dois com 494 aminoácidos (Figura 20). Foi observado ainda que a maioria das mutações encontradas ocorreu em regiões de conservação entre espécies.

Figura 23: Alinhamento da proteína HNF 1A normal com as prováveis proteínas mutadas dos pacientes com mutações no gene *HNF 1A* (pontilhados: mesma sequência de aminoácidos da sequência normal, A: alanina, R: arginina, N: aspargirina, D: ácido aspártico, C: cisteína, E: ácido glutâmico, Q: glutamina, G: glicina, H: histidina, I: isoleucina, L: leucina, K: lisina, M: metionina, F: fenilalanina, P: prolina, S: serina, T: treonina, W: triptofano, Y: tirosina, V: vallina).

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997; 20(7): 1183-1197.
2. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complication. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; 1999.
3. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*. 2010; 53(12):2504-8.
4. Lederman, HM Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet*. 1995; 345(8950): 648.
5. Møller, AM, Dalggaard, L T, Pociot, F, Nerup, J, Hansen, T, Pedersen, O. Mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in Caucasian families originally classified as having type I diabetes. *Diabetologia*. 1998; 41(12): 1528-1531.
6. Letho, M, Wipemo, C, Ivarsson, SA, Lindgren, C, Lipsanen-Nyman, M., Weng, J et al. High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia*. 1999; 42(9): 1131 – 1137.
7. Massa, O, Maxi, F, Cuesta-Munoz, A, Caumo, A, Cerutti, F, Toni, S et al. High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. *Diabetologia*. 2001; 44(7): 898-905.
8. Frayling, TM, Bulman, MP, Ellard, S, Appleton, M, Dronsfield, MJ, Mackie, ADR et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes*. 1997; 46(4): 720-725.
9. Vaxillaire M, Froguel P. Monogenic Diabetes in the Young, Pharmacogenetics and Relevance to Multifactorial Forms of Type 2 Diabetes. *Endocr Rev*. 2008; 29(3): 254-264.
10. Cappelli, A, Tumini, S, Consoli, A, Carinci, S, Piersanti, C, Ruggiero, G, Simonella, G, Soleti, F, Staffolani, P, Pianese, L. Novel mutations in GCK and HNF 1A genes in Italian families with MODY phenotype. *Diabetes Res. Clin Pract*. 2009; 83(3): e72 – e74 (on line).
11. Tack CJ, Ellard S, Hattersley AT. A severe clinical phenotype results from the co-inheritance of type 2 susceptibility genes and a hepatocyte nuclear factor-1A mutation. *Diabetes Care*. 2000; 23(3):424–425.
12. Harries, LW, Ellard, S, Stride, A, Morgan, NG, Hattersley, AT. Isoforms of the TCF 1 gene encoding hepatocyte nuclear factor – 1 show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Hum Mol Genet*. 2006;15(14): 2216– 2224.
13. Bellanné-Chantelot, C, Carette, C, Riveline, JP, Valéro, R, Gautier, JF, Larger, E, Reznik, Y, Ducluzeau, PH., Sola, A, Hartemann-Heurtier, A, Lecomte, P, Chaillous, L, Laloi-Michelin, M, Wilhem, JM, Cuny, P, Duron, F, Guerci, B, Jeandidier, N, Mosnier-Pudar, H, Assayag, M, Dubois-Laforgue, D, Velho, G, Timsit, J. The type and the position of NHEF 1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity onset diabetes of the young (MODY) – 3. *Diabetes*. 2008; 57(2): 503 – 508.
14. Lango Allen, H, Johansson, S, Ellard, S, Shields, B, Hertel, JK, Reader H, Colclough, K, Molven, A, Frayling, TM, Njolstad, PR, Hattersley, AT, Weedon, MN. Polygenic risk variants for type 2 diabetes susceptibility modify age at diagnosis in monogenic HNF 1A diabetes. *Diabetes*. 2010; 59(1): 266 – 71.
15. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT. B –cell genes and diabetes: Molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes*. 2001; 50(1): S94 – S100.
16. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of

- MODY in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia* 2012; 55(5):1265–1272 DOI 10.1007/s00125-011-2418-8.
17. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, et al. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase: definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 328(10): 697-702.
 18. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature.* 1996; 384(6608): 458-60.
 19. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature.* 1996; 384(6608): 455-458.
 20. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1b gene (TCF2) associated with MODY. *Nature Genet.* 1997;17(4): 384-385.
 21. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 1999; 23(3): 323 – 328.
 22. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type 2 diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet.* 1997; 17(2): 138-139.
 23. Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R. Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(40): 25929-25936.
 24. Kumar BV, Aleman-Gomez JA, Colwell N, Lopez-Candales A, Bosner MS, Spilburg CA, Lowe M, Lange LG. Structure of the human pancreatic cholesterol esterase gene. *Biochemistry.* 1992; 31(26): 6077 – 6081.
 25. Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawe N, Doi A, Furuta H, Nishi M, Nanjo K, Tantibhedhyangkul W, Boonyasrisawat W, Yenchitsomanus PT, Doria A, Banchuin N. PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2007; 92(7): 2821-2826.
 26. Molven A, Ringdal M, Nordbø AM, Raeder H, Støy J, Lipkind GM, Steiner DF, Philipson LH, Bergmann I, Aarskog D, Undlien DE, Joner G, Søvik O; Norwegian Childhood Diabetes Study Group, Bell GI, Njølstad PR. Mutations in the Insulin Gene Can Cause MODY and Autoantibody-Negative Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2008; 57(4):1131–1135.
 27. Borowiec M, Liew CW, Thompson R, Boonyasrisawat W, Hu J, Mlynarski WM, El Khattabi I, Kim SH, Marselli L, Rich SS, Krolewski AS, Bonner-Weir S, Sharma A, Sale M, Mychaleckyj JC, Kulkarni RN, Doria A. Mutation s at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(34): 14460 – 14465.
 28. Edghill EL, Minton JA, Groves CJ, Flanagan SE, Patch AM, Rubio-Cabezas O, Shepherd M, Lenzen S, McCarthy MI, Ellard S, Hattersley AT. Sequencing of candidate genes selected by beta cell experts in monogenic diabetes of unknown aetiology. *JOP.* 2010; 11(1): 14 – 17.
 29. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature.* 2001; 414(6865):788 – 791.
 30. Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nat Genet.* 1995; 994):418–423.
 31. Ellard S, Bulman MP, Frayling TM, Shepherd M, Hattersley AT. Proposed mechanism for a novel insertion/deletion frameshift mutation (I414G415ATCG–4CCA) in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) gene which causes maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat.* 2000; 16(3): 273.
 32. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med.* 2001; 345(13): 971 – 980.

33. Barrio R, Bellanné-Chantelot C, Moreno JC, Morel V, Calle H, Alonso M, Mustieles C. Nine Novel Mutations in Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) Candidate Genes in 22 Spanish Families. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87(6): 2532-2539.
34. Lim DM, Huh N, Park KY. Hepatocyte nuclear factor 1 – α mutation in normal glucose – tolerant subjects and early – onset type 2 diabetic patients. *Korean J Intern Med.* 2008; 23(4): 165 – 169.
35. Radha V, Ek J, Anuradha S, Hansen T, Pedersen O, Mohan V. Identification of novel variants in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in south Indian patients with maturity onset diabetes of young. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94(6):1959 –1965.
36. Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet Med.* 1998; 15(1):15–24.
37. Kawasaki E, Sera Y, Yamakawa K, Abe T, Ozaki M, Uotani S, Ohtsu N, Takino H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Matsuura N, Eguchi K. Identification and functional analysis of mutations in the hepatocyte nuclear factor - 1 α gene in anti-islet autoantibody-negative Japanese patients with type 1 diabetes. *J. Clinical. Endocrinol. Metab.* 2000; 85(1): 331 – 335.
38. Møller AM, Dalgaard LT, Pociot F, Nerup J, Hansen T, Pedersen O. Mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in Caucasian families originally classified as having type I diabetes. *Diabetologia.* 1998; 41(12): 1528-1531.
39. Chèvre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanché H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E, Charpentier G, Beckers D, Maes M, Bellanné-Chantelot C, Velho G, Froguel P.. Mutation screening in 18 Caucasian families suggests the existence of other MODY genes. *Diabetologia.* 1998; 41(9): 1017-23.
40. Moises RS, Reis AF, Morel V, Chacra AR, Dib SA, Bellanne-Chantelot C, Velho G. Prevalence of Maturity-Onset Diabetes of the Young Mutations in Brazilian Families With Autosomal-Dominant Early-Onset Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2001; 24(4): 786-788.
41. Maraschin, JF, Kannengiesser, C, Murussi, N, Campagnolo, N, Canani, LH, Gross, JL, Velho, G, Grandchamp, B, Silveiro, SP. HNF-1 mutations are present in half of clinically defined MODY patients in south-brazilian individuals. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2008; 52(8): 1326 – 1331.
42. Nogaroto V, Svidnicki PV, Bonatto N, Milléo FQ, Almeida MC, Vicari MR, Artoni RF. New HNF - 1 α nonsense mutation causes maturity - onset diabetes of the young type 3. *Clinics.* 2011; 66(1): 167–168.
43. Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Hattersley AT. Intrauterine hyperglycemia is associated with an earlier diagnosis of diabetes in HNF-1 α gene mutation carriers. *Diabetes Care.* 2002; 25(12):2287–2291.
44. Kim SH, Ma X, Klupa T, Powers C, Pezzolesi M, Warram JH, Rich SS, Krolewski AS, Doria A. Genetic modifiers of the age at diagnosis of diabetes (MODY 3) in carries of hepatocyte nuclear factor - 1 α mutations mao chromosomes 5p15, 9q22 and 14q24. *Diabetes.* 2003; 52(8): 2182 – 2186.
45. Shepherd M, Shields B, Ellard S, Rubio-Cabezas O, Hattersley AT. A genetic diagnosis of HNF1A diabetes alters treatment and improves glycaemic control in the majority of insulin-treated patients. *Diabet Med.* 2009; 26(4): 437–441.
46. Pontoglio M, Prié D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M, Friedlander G. HNF 1 α controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* 2000; 1(4): 359 – 365.
47. Ryffel, GU. Mutations in the Human Genes Encoding the Transcription Factors of the Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)1 and HNF4 Families: Functional and Pathological Consequences. *J Mol Endocrinol.* 2001; 27(1):11 - 27.
48. Bach I, Galcheva-Gargova Z, Mattei MG, Simon-Chazottes D, Guénet JL, Cereghini S, Yaniv M. Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localizations of its gene in man and mouse. *Genomics.* 1990; 8(1):155 – 164.

49. Bonatto N. Prospecção de mutações gênicas relacionadas ao diabetes mellitus tipo MODY na região dos Campos Gerais, Paraná. 58 p. Trabalho de conclusão de curso (Pós-Graduação em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011.
50. Ferrer J. A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes*. 2002; 51(8): 2355-2362.
51. Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Dominant-Negative Suppression of HNF-1 α Function Results in Defective Insulin Gene Transcription and Impaired Metabolism-Secretion Coupling in a Pancreatic β -Cell Line. *EMBO J*. 1998;17(22):6701-13.
52. Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K, Seino Y. Hepatocyte nuclear factor-1 α recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. *Diabetes*. 2002; 51(5):1409-1418.
53. Holmkvist J, Cervin C, Lyssenko V, Winckler W, Anevski D, Cilio C, Almgren P, Berglund G, Nilsson P, Tuomi T, Lindgren CM, Altshuler D, Groop L. Common variants in HNF - 1 α and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006;49(12):2882 – 2891.
54. Satoh S, Noaki T, Ishigure T, Osada S, Imagawa M, Miura N, Yamada K, Noguchi T. Nuclear factor 1 family members interact with hepatocyte nuclear factor 1 α to synergistically activate L-type pyruvate kinase gene transcription. *J Biol Chem*. 2005;280(48):39827-34.
55. Ellard, S, Colclough, K. 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*. 2006; 27(9): 854-869.
56. Ellard S. Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha (HNF-1 α) Mutations in Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Hum Mutat*. 2000; 16(5):377 – 385.
57. Shepherd M, Sparkes AC, Hattersley AT. Genetic testing in maturity onset diabetes of the young (MODY); a new challenge for the diabetic clinic. *Pract Diabetes Int*. 2001; 18(5):16–21.
58. Uchizono Y, Baldwin AC, Sakuma H, Pugh W, Polonsky KS, Hara M. Role of HNF - 1 α in regulating the expression of genes involved in cellular and proliferation in pancreatic beta – cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009; 84(1):19-26.
59. Cereghini S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 1996;10:267-282.
60. Bach I, Pontoglio M, Yaniv M. Structure of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1). *Nucleic Acids Res*. 1992; 20(16): 4199-4204.
61. Chi YI, Frantz JD, Oh BC, Hansen L, Dhe-Paganon S, Shoelson SE. Diabetes Mutations Delineate an Atypical POU Domain in HNF-1 α . *Mol Cell*. 2002; 10(5): 1129-1137.
62. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*. 2004; 303(5662):1378-1381.
63. American Diabetes Association. Implementation of treatment protocols in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 1995; 18(3): 361-376.
64. Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do Diabetes Mellitus e tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2003.
65. Songer TJ, LaPorte R, Lave JR, Dorman JS, Becker DJ. Health insurance and the financial impact of IDDM in families with a child with IDDM. *Diabetes Care*. 1997; 20(4): 577- 584.
66. Cameron FJ, Widdison J, Boyce D, Gebert R. A comparison between optimal and actuarial health care costs of adolescents with diabetes. *J Paediatr Child Health*. 2004; 40(1-2): 56-59.

67. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq Bras Cardiol. 95(1-suppl1): 1-51, 2010.
68. Costa EC, Soares EMM, Lemos TMAM, Maranhão TMO, Azevedo GD. Índices de Obesidade Central e Fatores de Risco Cardiovascular na Síndrome dos Ovários Policísticos. Arq Bras Cardiol, 2010;94(5):633-638.
69. Ellard, S, Colclough K. 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. Hum Mutat. 2006; 27(9): 854 - 869.
70. Ferrer-Costa C, Gelpí JL, Zamakola L, Parraga I, de la Cruz X, Orozco M. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. Bioinformatics. 2005; 21(14):3176-3178.
71. Nakken S, Alseth I, Rognes T. Computational prediction of the effects of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. Neuroscience. 2007;145(4):1273-1279
72. Ng MC, Lee SC, Ko GT, Li JK, So WY, Hashim Y, Barnett AH, Mackay IR, Critchley JA, Cockram CS, Chan JC. Familial early-onset type 2 diabetes in Chinese patients: obesity and genetics have more significant roles than autoimmunity. Diabetes Care. 2001; 24(4):663-671

ANEXO

ANEXO A



Universidade Federal do Maranhão
Hospital Universitário
Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer N° 049/10

Registro do CEP:186/09 Processo N°: 004798/2009-00

Pesquisador (a) Responsável: Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal Mesquita

Equipe executora: Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal Mesquita, Ana Gregória Ferreira Pereira de Almeida, Manuel dos Santos Faria e Bruno de Almeida Nunes

Tipo de pesquisa: Projeto de Pesquisa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil

Instituição onde será desenvolvido: Hospital Universitário Presidente Dutra – UFMA

Situação: APROVADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Federal do Maranhão analisou na sessão do dia **20.11.09** o Processo N°: **004798/2009-00**, referente ao projeto de pesquisa: **"MODY em pacientes atendidos no ambulatório de Diabetes tipo 1 do HUUFMA em São Luís-MA"**, tendo como pesquisador (a) responsável: **Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal Mesquita**, cujo objetivo geral é **"Determinar a prevalência de MODY entre os pacientes atendidos no ambulatório de DM"**.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde / MS.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a este CEP, relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final gravado em CD-ROM.

São Luís, 10 de março de 2010

João Inácio L. de Souza
Prof. Dr. João Inácio Lima de Souza
Coordenador do CEP-HUUFMA
Ethica homini habitat est

ANEXO B

MODY EM PACIENTES DIABÉTICOS ATENDIDOS NO
AMBULATÓRIO DE DIABETS TIPO 1 DO HUUFMA – SÃO
LUÍS – MA.

Questionário

A: Hora do início da entrevista : :

Horas minutos

B: Informante: (1) Próprio paciente (2) Outro ☐

1. Informações gerais			
1.1. Cidade			0 1 [] []
1.2. Estado			[] []
1.3. Código do local			1 []
1.4. Nível de atenção	(1) Primária (2) Secundária (3) Terciária		3 []
1.5. Identificação do entrevistador			0 1 1 [] [] [] []
1.6. Data da entrevista (dia/mês/ano)			[] [] / [] [] / [] [] [] []
1.7. Número de Registro no hospital/Centro			[] [] [] [] [] [] [] []
1.8. Tempo de seguimento no Centro (em meses)			[] [] [] []

2. Consentimento e identificação					
2.1. O consentimento foi assinado?	(1) Sim	(2) Não			
2.2. Qual o seu nome? (Letra de forma)					
2.3. Local (A) e Número de telefone principal de contato (B)?	(1) Casa (2) Trabalho (3) Vizinho (4) Celular (5) Não tem	A. ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ B. ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐			
2.4. Endereço atual? (Letra de forma)					
2.5. CEP	 (99999999) Não sabe		☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐		
2.6. Sexo	(1) Masculino (2) Feminino				
2.7. Idade, em anos			☐ ☐		

2.8. Data de nascimento (dia/mês/ano)		/ /
2.9. Estado onde nasceu? (Letra de forma)		
2.10. Cor (auto-referida)	(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena	
2.11. Estado Civil	(0) Não se aplica (criança) (1) Solteiro (2) Casado/ amasiado (3) Viúvo (4) Separado / divorciado	
2.12. Qual a sua escolaridade?	(0) Não se aplica (criança) (1) Analfabeto (2) Ensino fundamental incompleto(1ºG) (3) Ensino fundamental completo (4) Ensino médio incompleto(2º.G) (5) Ensino médio completo (6) Ensino superior incompleto (7) Ensino superior completo (8) Pós-graduação	
2.13. Anos de estudo até o momento?		
2.14. Atividade profissional principal nos últimos 12 meses?	(0) Não se aplica (criança) (1) Funcionário público (2) Trabalhador c/ carteira assinada (3) Autônomo (4) Estudante (5) Dona de casa (6) Aposentado (7) Desempregado pelo diabetes (8) Desempregado por outros motivos (9) Voluntário (10) Licenciado pelo INSS ou outros (11) Outros _____	
2.15. Descrição da função dentro da categoria profissional (Letra de forma)		
2.16. Aposentadoria	(0) Não se aplica (criança ,adolescente ,jovem) (1) Sim, no tempo normal (2) Não (3) Sim, mais precoce pelo diabetes	
2.17. Ano da Aposentadoria	(0000) Não se aplica. Não se aposentou	

2.18. Qual é a renda mensal familiar, em salários mínimos?		(1) menos de 01 salário (2) 01 a 05 salários (3) 06 a 10 salários (4) 11 a 15 salários (5) mais de 16 salários (9) Não sabe informar						
2.19. Quantas pessoas vivem com a renda?		(1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4 (5) 5 ou mais						
2.20. Quais destes itens você possui? E quantos? Posse de itens: 0; 1; 2; 3; 4 ou +	Itens	Não tem	1	2	3	4 ou +		
	A. Televisão em cores						A.	
	B. Rádio						B.	
	C. Banheiro						C.	
	D. Automóvel						D.	
	E. Empregada com carteira assinada						E.	
	F. Aspirador de pó						F.	
	G. Máquina de lavar roupas / tanquinho						G.	
	H. Vídeo cassete ou DVD						H.	
	I. Geladeira						I.	
	J. Freezer duplex ou separado						J.	
	3. Sintomas iniciais do DM							
3.1. Idade ao diagnóstico de diabetes, em anos.								
		(99) Não sabe						
3.2. Mês e Ano de diagnóstico do diabetes								
Caso não souber o mês por só o ano		(99) Não sabe						
3.3. Quais os principais sintomas que você teve quando foi diagnosticado o Diabetes?		A. Polis (poliúria , polidipsia, polifagia) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe B. Astenia (cansaço) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe C. Enurese noturna (urinar na cama) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe D. Parestesias (formigamento) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe E. Baixa Acuidade Visual .(dificuldade com a visão).... (1) Sim (2) Não (9) Não sabe					A. B. C. D. E.	

	F. Prurido (coceira) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe G. Anorexia (falta de apetite) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe H. Sonolência (1) Sim (2) Não (9) Não sabe I. Deficiência de Crescimento (1) Sim (2) Não (9) Não sabe J. Infecções de repetição (1) Sim (2) Não (9) Não sabe K. Perda de peso (1) Sim (2) Não (9) Não sabe L. Outros (descrever) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe _____	F. ☐ G. ☐ H. ☐ I. ☐ J. ☐ K. ☐ L. ☐
3.4. Infecção nos últimos 6 meses antes do diagnóstico do diabetes?	A. Caxumba (1) Sim (2) Não (9) Não sabe B. Rubéola (1) Sim (2) Não (9) Não sabe C. Catapora (1) Sim (2) Não (9) Não sabe D. Dengue (1) Sim (2) Não (9) Não sabe E. Rotavirus (1) Sim (2) Não (9) Não sabe F. Citomegalovirus (1) Sim (2) Não (9) Não sabe G. Sarampo (1) Sim (2) Não (9) Não sabe H. Amigdalite (1) Sim (2) Não (9) Não sabe I. Outros (1) Sim (2) Não (9) Não sabe	A. ☐ B. ☐ C. ☐ D. ☐ E. ☐ F. ☐ G. ☐ H. ☐ I. ☐
3.5 Como foi feito o diagnóstico do diabetes?	(1) Glicemia de jejum (2) Curva glicêmica (3) Glicemia ao acaso (4) Internação/cetoacidose/hiperosmolar (5) Outros (especificar) _____	☐
3.6. Qual foi o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico?	(1) < 4 semanas (1 mês) (2) 1 a 6 meses (3) 6 a 1 ano (4) > 1 ano	☐
3.7. Acredita que algum fato emocional ou psicológico contribuiu para o início da doença?	(1) Sim (2) Não (9) Não sabe	☐
4. História pessoal		
4.1. Qual o peso ao nascimento?	(1) Menor que 2 kg (2) Entre 2,1kg e 2,5kg (3) Entre 2,6 kg e 3kg (4) Entre 3,1 kg e 3,5 kg (5) Entre 3,6 kg e 4kg (6) Maior que 4kg (9) Não sabe	☐
4.2. Teve amamentação exclusiva com leite materno nos primeiros três meses de vida?	(1) Sim (2) Não (9) Não sabe	☐
4.3. Completou esquema de vacinação do Ministério da Saúde?	(1) Sim (2) Não (9) Não sabe	☐
4.4. Idade da primeira menstruação.	Anos: _____ (00) Não se aplica (homem ou criança)	☐ ☐
4.5. Idade da menopausa	() Sim (Anos) _____ (02) Ausente (00) Não se aplica (homem ou criança)	☐ ☐
4.6. Menopausa cirúrgica?	() Sim (Anos) _____	☐ ☐

	(02) Ausente (00) Não se aplica (homem ou criança)	
4.7. Número de gestações que já teve?	(0) Não se aplica (homem ou criança) (1) Nenhuma (2) Uma (3) Duas (4) Três (5) Quatro (6) Cinco ou mais	
4.8. Usa anticoncepcional hormonal ?	(1) Sim (2) Não (0) Não se aplica (homem ou criança)	
4.9. Algum médico lhe informou que você tem pressão alta (hipertensão arterial)?	(1) Sim (2) Não (9) Não sabe	
4.10.1. Ano ao diagnóstico da pressão alta (hipertensão arterial)	_____	
4.10.2. Idade ao diagnóstico da pressão alta (hipertensão arterial)	_____ anos	
4.11. Em relação ao fumo, em que opção você se enquadra?	(0) Não se aplica (criança) (1) Fuma (2) Ex-fumante (3) Nunca fumou	
4.12. Em relação ao consumo de bebidas alcoólicas, em que opção você se enquadra?	(0) Nunca bebeu ou não se aplica (criança) (1) Consome diariamente (2) Às vezes consome (3) Consumiu no passado, mas não consome atualmente	
4.13. Em caso de consumo de bebida alcoólica (atual ou passado), descrever a frequência do consumo (número de vezes/semana)	_____ vezes por semana (99) Não sabe (00) Nunca bebeu ou não se aplica (criança)	
4.14. Em relação ao uso de drogas, em que opção você se enquadra?	(0) Não se aplica (criança) (1) É usuário (2) Ex-usuário (3) Nunca usou drogas	
4.15. Em caso de uso de drogas (atual ou ex-usuário), descrever qual droga	(0) Não se aplica (criança) (1) Maconha (2) Cocaína (3) Crak (4) Ecstasy (5) Outros	
4.16. Pratica exercícios de rotina?	(1) Apenas no fim de semana (2) 2 a 3 vezes na semana (3) 3 a 5 vezes na semana (4) + 5 vezes na semana (5) Não	
4.17. Em relação ao uso de anabolizantes (hormonal), em que opção você se enquadra?	(0) Não se aplica (criança) (1) É usuário (2) Ex-usuário (3) Nunca usou anabolizantes	
4.18. A sua vontade de ter relações sexuais (libido) está alterada?	(0) Não se aplica (criança) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe ou não quis responder	
4.19. Com que frequência você faz exames dos dentes e da gengiva?	(0) Nunca fez (1) 1 vez /ano (2) 2 vez /ano (3) 1 vez /5 anos (9) Não sabe	

5. História familiar

5.1. Diabetes tipo 1

(1) Pai

(2) Mãe

Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1ºgrau marcar com um círculo em volta dos números correntes e por o número 6 na casela	(3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1ºgrau (7) Avós ou Tios ou Primos (8) Não há histórico familiar	
5.2. Diabetes tipo 2. Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1ºgrau marcar com um círculo em volta dos números correspondentes e por o número 6 na casela	(1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1ºgrau (7) Avós ou Tios ou Primos (8) Não há histórico familiar	
5.3. Obesidade. Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1ºgrau marcar com um círculo em volta dos números correspondentes e por o número 6 na Ca	(1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1ºgrau (7) Avós ou Tios ou Primos (8) Não há histórico familiar	
5.4. Hipertensão arterial(pressão alta). Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1ºgrau marcar com um círculo em volta dos números correspondentor o número 6 na casela	(1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1ºgrau (7) Avós ou Tios ou Primos (8) Não há histórico familiar	
5.5. Doença coronariana precoce(doença do coração com enfarte , dor no peito ao esforço físico) < 55 anos (homem) < 65 anos (mulher) Grau de parentesco com o indivíduo?	(1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Avós ou Tios ou primos (6) Não há histórico familiar	
5.6. Doenças autoimunes 5.6.1. Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1ºgrau marcar com um círculo em volta dos números corentes e por o número 6 na casela	A. Doença Tireoidopatias autoimunes (1) Sim (2) Não (9) Não sabe	B. Parentesco (1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1ºgrau (7) Avós ou Tios ou Primos (MARCAR QUAL) (8) Não há histórico familiar A. B.

5.6.2. Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1º grau marcar com um círculo em volta dos números correspondentes e por o número 6 na casela	Doença Celíaca (1) Sim (2) Não (9) Não sabe	(1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1º grau (7) Avós ou Tios ou Primos (MARCAR QUAL) (8) Não há histórico familiar	A. ☐ B. ☐
5.6.3. Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1º grau marcar com um círculo em volta dos números correspondentes e por o número 6 na casela	Vitiligo (manchas brancas pelo corpo) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe	(1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1º grau (7) Avós ou Tios ou Primos (MARCAR QUAL) (8) Não há histórico familiar	A. ☐ B. ☐
5.6.4. Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1º grau marcar com um círculo em volta dos números correspondentes e por o número 6 na casela	Alopecia (queda de cabelo acentuada) (1) Sim (2) Não (9) Não sabe	(1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1º grau (7) Avós ou Tios ou Primos (MARCAR QUAL) (8) Não há histórico familiar	A. ☐ B. ☐
5.6.5. Qual o grau de parentesco com o indivíduo? Quando for mais que 1 parente de 1º grau marcar com um círculo em volta dos números correspondentes e por o número 6 na casela	Artrite reumatóide (1) Sim (2) Não (9) Não sabe	(1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Irmã (5) Filho(a) (6) Mais de um parente em 1º grau (7) Avós ou Tios ou Primos (MARCAR QUAL) (8) Não há histórico familiar	A. ☐ B. ☐

6. Avaliação da dieta

6.1. Você faz algum tipo de dieta?	(1) Sim (2) Não	☐
6.2. No último ano teve consulta com nutricionista?	(1) Sim (2) Não	☐
6.3. Quem é o principal orientador de sua alimentação?	(1) Nutricista (2) Médico (3) Outro profissional de saúde (4) Leigo (5) Revistas/Jornais	☐
6.4. Você segue a dieta recomendada?	(1) Sim (2) Não	☐
6.5. Qual o tipo principal de dieta você faz	(1) Restringe apenas açúcares (2) Dieta de calorias (3) Contagem de carboidratos (4) Índice glicêmico (5) Os _____	☐
6.6. Quanto você acha que segue sua dieta?	(1) 100% (2) 80% (3) 50% (4) Menos de 50%	☐
6.7. Qual a maior dificuldade que você acha para	A. Deixar de r doces (1) Sim (2) Não	A. ☐

seguir a dieta.	B. Comer verduras, legumes e frutas (1) Sim (2) Não C. Respeitar a quantidade da alimentação (1) Sim (2) Não D. Respeitar o horário da alimentação (1) Sim (2) Não E. Entender as listas de substituição de alimentos fornecidas junto com a dieta (1) Sim (2) Não	B. ☐ C. ☐ D. ☐ E. ☐
6.8. Qual alimento é usado para tratar a hipoglicemia?	(1) Doces (2) Açúcar (3) Suco de fruta (4) Biscoito recheado ,bolachas ou pão (5) Outros. Especificar _____	☐
6.9. Consome produtos dietéticos?	(1) Sim (2) Não	☐

7. Atividades educativas em diabetes

7.1. Você teve consulta de enfermagem no último ano?	(1) Sim (2) Não	☐
7.2. Você participou de algum grupo de reunião de pacientes diabéticos no último ano?	(1) Sim (2) Não	☐
7.3. Você participou de algum programa educação para pacientes diabéticos no último ano?	(1) Sim (2) Não	☐

8. Uso de insulina

8.1. Qual a insulina lenta que está usando no momento	(1) NPH (2) Glargina (3) Detemir (4) Outra _____	☐
8.2. Dose da insulina Lenta que está usando no momento	A. Dose U/dia _____ (000) Não se aplica (999) Não sabe B. Dose U/kg _____ (000) Não se aplica (999) Não sabe	A. ☐ ☐ ☐ B. ☐ ☐ ☐
8.3. Número de aplicações por dia da insulina Lenta que está usando no momento	(1) Uma vez (2) Duas vezes (3) Três vezes (4) Quatro vezes (9) Não sabe	☐
8.4. Como obtêm a insulina lenta que está usando no momento	(1) Recebe grátis no seu hospital (2) Recebe grátis na farmácia do SUS (3) Compra na farmácia popular (4) Compra em farmácia comum (5) Recebe grátis após mandato judicial	☐

	(6) Outra fonte? _____ (9) Não sabe	
8.5 Faz uso no momento de insulina de ação rápida? Se não pular para a questão 8.10 e preencher a casela com 0	(1) Sim (2) Não (9) Não sabe	
8.6 Qual a insulina de ação rápida que está usando no momento	(1) Regular (2) Lispro (3) Aspart (4) Outra _____	
8.7. Como obtém a insulina rápida que está usando no momento	(1) Recebe grátis no seu hospital (2) Recebe grátis na farmácia do SUS (3) Compra na farmácia popular (4) Compra em farmácia comum (5) Recebe grátis após mandato judicial (6) Outra fonte? _____ (9) Não sabe	
8.8. Dose de insulina de ação rápida que está usando no momento (exemplo ontem)	A. Dose U/dia _____ (000) Não se aplica (999) Não sabe B. Dose U/kg _____ (000) Não se aplica (999) Não sabe	A. B.
8.9. Número de aplicações por dia de insulina de ação rápida que está usando no momento	(1) Uma vez (2) Duas vezes (3) Três vezes (4) Quatro vezes (9) Não sabe	
8.10 Faz auto-monitorização da glicemia em casa no momento Se não faz pular para a questão 8.13 e preencher a casela com 0	(1) Sim (2) Não (9) Não sabe	
8.11. Como obtém as fitas para auto-monitorização	(1) Recebe grátis no seu hospital (2) Recebe grátis na farmácia do SUS (3) Compra na farmácia popular (4) Compra em farmácia comum (5) Recebe grátis após mandato judicial (6) Outra fonte? _____ (9) Não sabe	
8.12. Número de medições da glicemia por dia	(0) Nenhuma (7) sete a oito (1) Uma (8) Mais de 8 (2) Duas (9) Outros: descrever _____ (3) Três (4) Quatro (5) Cinco (6) Seis	
8.13 Usa aparelho de Bomba de Insulina Se não usa pular para a questão 9 e preencher a casela com 0	(1) Sim (2) Não (9) Não sabe	
8.14. Aparelho de Bomba de Insulina	(1) Recebe grátis no seu hospital	

	(2) Recebe grátis na farmácia do SUS (3) Compra direta da indústria (4) Recebe grátis após mandato judicial (5) Outra fonte? _____ (9) Não sabe	☐
8.15. Dose Total diária de insulina	A. Dose U/dia _____ (000) Não se aplica (999) Não sabe B. Dose U/kg _____ (000) Não se aplica (999) Não sabe	A. ☐ ☐ ☐ B. ☐ ☐ ☐
8.16 Com adquire os insumos do Aparelho de Bomba de Insulina	(1) Recebe grátis no seu hospital (2) Recebe grátis na farmácia do SUS (3) Compra direto da indústria (4) Compra em farmácia comum (5) Recebe grátis após mandato judicial (6) Outra fonte? _____ (9) Não sabe	☐

9. Uso de outras medicações

Complete a tabela seguinte de acordo com as respostas dadas pelo paciente ou que constam no prontuário médico na última consulta referente às medicações em uso

Nome da medicação	A. Em uso?	B. Dose diária total	
9.1. Estatina	(1) Sim	_____ mg	A. ☐
Princípio Ativo:	(2) Não	(00) Não se aplica	B. ☐ ☐
9.2. IECA	(1) Sim	_____ mg	A. ☐
Princípio Ativo:	(2) Não	(000) Não se aplica	B. ☐ ☐ ☐
9.3. Diurético	(1) Sim		A. ☐
	(2) Não		
9.3.1. Diurético TIPO Tiazídicos e similares	(1) Sim	_____ mg	A. ☐
	(2) Não	(000) Não se aplica	B. ☐ ☐ ☐
9.3.2. Diurético TIPO Furosemida	(1) Sim	_____ mg	A. ☐
	(2) Não	(000) Não se aplica	B. ☐ ☐ ☐
9.3.3. Outros Diuréticos	(1) Sim	_____ mg	A. ☐
	(2) Não	(000) Não se aplica	

			B. ☐ ☐ ☐
9.4. Inibidor de receptor AT1	(1) Sim (2) Não	_____ mg (000) Não se aplica	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐
9.5. Beta bloqueador	(1) Sim (2) Não	_____ mg (000) Não se aplica	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐
9.6. Bloqueador de Canal de cálcio	(1) Sim (2) Não	_____ mg (000) Não se aplica	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐
9.7. Metformina	(1) Sim (2) Não	_____ mg (0000) Não se aplica	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐ ☐
9.8. Hormônio Tireoidiano	(1) Sim (2) Não	_____ µg (000) Não se aplica	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐
9.9 . AAS ou similares	(1) Sim (2) Não	_____ µg (000) Não se aplica	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐
9.10 Outros medicamentos (uso contínuo)	(1) Sim (2) Não	Nome _____ Dose _____	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐

10. EUROQOL: Avaliação da Qualidade de Vida (realizar apenas em pacientes com idade ≥ 10 anos)

Solicitar ao paciente que informe como se sente hoje em relação à:

10.1. Mobilidade	(1) Não tenho problemas em andar (2) Tenho alguns problemas em andar (3) Estou limitado a ficar na cama	☐
10.2. Cuidados Pessoais	(1) Não tenho problemas com os meus cuidados pessoais (2) Tenho alguns problemas para me lavar ou me vestir	☐

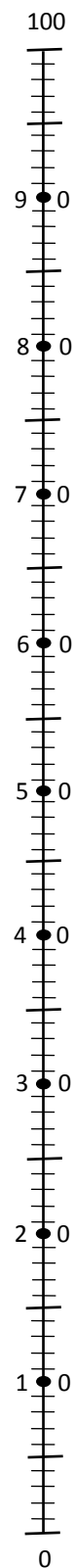
	(3) Sou incapaz de me lavar ou vestir sozinho	
10.3. Atividades Habituais (<i>ex. trabalho, estudos, atividades domésticas, atividades em família ou de lazer</i>)	(1) Não tenho problemas em desempenhar as minhas atividades habituais (2) Tenho alguns problemas em desempenhar as minhas atividades habituais (3) Sou incapaz de desempenhar as minhas atividades habituais	☐
10.4. Dor/Mal Estar	(1) Não tenho dores ou mal-estar (2) Tenho dores ou mal-estar moderados (3) Tenho dores ou mal-estar extremos	☐
10.5. Ansiedade/Depressão	(1) Não estou ansioso (a) ou deprimido (a) (2) Estou moderadamente ansioso (a) ou deprimido (a) (3) Estou extremamente ansioso (a) ou deprimido (a)	☐

10.6. Para ajudar as pessoas a dizer quão bom ou mau o seu estado de saúde é nós desenhamos uma escala (semelhante a um termômetro) na qual o melhor estado de saúde que possa imaginar é marcado por 100 e o pior estado de saúde que possa imaginar é marcado por 0.

Solicitar ao paciente que marque na escala a nota que classifica o seu estado de saúde e escreva ao lado a nota aferida.

□ □ □

O melhor estado de
saúde imaginável



O pior estado de saúde
imaginável

11. Dados do prontuário médico ou obtidos durante a entrevista		
11.1. Data da última informação do prontuário Dia / Mês / Ano: (caso não tenha o dia, completar com Mês / Ano e, se não tiver o Mês, completar apenas com o Ano) ou obtidos no dia da entrevista	_____ / _____ / _____	□ □ . □ □ . □ □ □ □
11.2. Quantas consultas médicas compareceu no serviço no último ano?	(1) Uma (2) Duas (3) Três (4) Quatro (5) Cinco (6) Seis (7) Sete ou mais (0) Nenhuma	□
11.3. Qual a causa das consultas do último ano?	(1) Hipoglicemia (2) Hiperglicemia (3) Infecções (4) Rotina (5) Outras	□
11.4. Peso (kg) (pode ser o obtido durante a entrevista)	_____ kg (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.5. Altura, em centímetros (pode ser a obtido durante a entrevista)	_____ cm (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.6. Circunferência abdominal, em centímetros (pode ser a obtida durante a entrevista)	_____ cm (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.7. Circunferência quadril, em centímetros (pode ser a obtida durante a entrevista)	_____ cm (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.8. Circunferência pescoço, em centímetros (pode ser a obtida durante a entrevista)	_____ cm (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.9. Circunferência coxa direita, em centímetros (pode ser a obtida durante a entrevista)	_____ cm (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.10. Pressão arterial sistólica? (pode ser a obtida durante a entrevista)	_____ mmHg (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.11. Pressão arterial diastólica? (pode ser a obtida durante a entrevista)	_____ mmHg (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.12. Frequência cardíaca (pode ser a obtida durante a entrevista)	_____ (999) Sem dados no prontuário	□ □ □
11.13. Existe a presença de <i>acanthosis</i>	(1) Sim (2) Não	

nigricans?	(9) Sem dados no prontuário	☐
11.14. Episódios de hipoglicemia no último 1 mês	(1) Sim (2) Não (9) Sem dados no prontuário	☐
11.14.1. Se sim, esse episódio foi leve? Quantas vezes aconteceram no último mês?	(1) Sim, _____ vezes (2) Não (9) Sem dados no prontuário	A. ☐ B. ☐ ☐ vezes
11.14.2. Se sim, esse episódio foi moderado? Quantas vezes aconteceram no último mês?	(1) Sim, _____ vezes (2) Não (9) Sem dados no prontuário	A. ☐ B. ☐ ☐ vezes
11.14.3. Se sim, esse episódio foi Grave (mudança de comportamento, perda de consciência, internação)? Quantas vezes aconteceram no último mês?	(1) Sim, _____ vezes (2) Não (9) Sem dados no prontuário	A. ☐ B. ☐ ☐ vezes
11.14.4. Se sim, esse episódio foi Assintomático ($\leq 40\text{mg/dl}$)? Quantas vezes aconteceram no último mês?	(1) Sim, _____ vezes (2) Não (9) Sem dados no prontuário	A. ☐ B. ☐ ☐ vezes
11.14.5. Se sim, esse episódio foi Assintomático ($<70\text{mg/dl}$)? Quantas vezes aconteceram no último mês?	(1) Sim, _____ vezes (2) Não (9) Sem dados no prontuário	A. ☐ B. ☐ ☐ vezes
11.15. Consta algum episódio de internação por hiperglicemia no último ano?	(1) Sim (2) Não (9) Sem dados no prontuário	☐
11.16. Consta algum episódio de internação por cetoacidose diabética no último ano?	(1) Sim (2) Não (9) Sem dados no prontuário	☐
11.17. Exame de fundo de olho no último ano?	(1) Sim (2) Não (9) Sem dados no prontuário	☐
11.18. Retinopatia	(0) Ausente (1) Pré proliferativa (2) Proliferativa (9) Sem dados no prontuário	☐
11.19. Laserterapia	(1) Sim (2) Não (9) Não há dados no prontuário	A. ☐ Data da última: mês e ano B. ☐ ☐ - ☐ ☐ ☐ ☐

11.20. Vitrectomia	(1) Sim (2) Não (9) Sem dados no prontuário	A. ☐ Data da última: mês e ano B. ☐ ☐ - ☐ ☐ ☐ ☐
11.21. Tem outras patologias oculares?	(0) Não tem (1) Catarata (2) Glaucoma (3) Outras (9) Sem dados no prontuário	☐
11.22. O centro faz exame de microalbuminúria ou encaminha para realizar em laboratório fora da instituição?	(1) Sim, o centro faz de rotina (2) Sim, o centro faz mas só para pesquisa (3) O centro encaminha para realizar em laboratório fora da instituição (4) O centro não faz e não encaminha para realizar fora	☐
11.23. Microalbuminúria	A. Frequência / ano _____ (9) Sem dados no prontuário B. Valor da última _____ (99 99) Sem dados no prontuário C. Unidade ug/min; mg/L ou mg / 24horas (9999) Sem dados no prontuário	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐ ☐ C. ☐ ☐ ☐ ☐
11.24. Proteinúria	A. Frequência / ano _____ (9) Sem dados no prontuário B. Valor da última _____ (9999) Sem dados no prontuário C. Unidade:mg /24 horas ou gr/24hs ____ (9999) Sem dados no prontuário	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐ ☐ C. ☐ ☐ ☐ ☐
11.25. Depuração de creatinina	A. Frequência / ano _____ (9) Sem dados no prontuário B. Valor da última _____ (9999) Sem dados no prontuário	A. ☐ B. ☐ ☐ ☐ ☐
11.26. Nefropatia diabética	(0) Não tem nefropatia diabética(ND) (1) Nefropatia por microalbuminúria (confirmada em 2 amostras) (2) Nefropatia por proteinúria (confirmada em 2 amostras) (3) Doença renal crônica em tratamento conservador (4) Doença renal crônica em tratamento por hemodiálise (5) Doença Renal Crônica em tratamento por diálise peritoneal (6) Transplante renal (9) Não constam dados no prontuário	☐
11.27. Neuropatia diabética	(0) Não tem neuropatia (1) Neuropatia sensório motora ou polineuropatia simétrica distal (2) Mononeuropatia (3) Neuropatia Autonômica Cardiovascular (4) Neuropatia Autonômica Gastrointestinal (5) Neuropatia Autonômica Genitourinaria (disfunção erétil) (6) Neuropatia Autonômica Genitourinaria (bexiga neurogênica) (9) Não consta do prontuário	☐
11.28. Doença coronariana Clínica	A. Angina (1) Sim (2) Não (9) Não consta B. Infarto Prévio (1) Sim (2) Não (9) Não consta C. Revascularizado (1) Sim (2) Não (9) Não consta D. Angioplastia (1) Sim (2) Não (9) Não consta	A. ☐ B. ☐ C. ☐ D. ☐
	A. ECG de repouso (1) Sim (2) Não (9) Não consta B. Teste ergométrico (1) Sim (2) Não (9) Não consta C. Eco de estresse (1) Sim (2) Não (9) Não consta	A. ☐ B. ☐ C. ☐

11.29. Investigação de Doença Coronariana	D. Cintilografia (1) Sim (2) Não (9) Não consta E. Escore de Cálcio (1) Sim (2) Não (9) Não consta F. Cinecoronariografia (1) Sim (2) Não (9) Não consta G. Outros (descrever) _____ (1) Sim	D. ☐ E. ☐ F. ☐ G. ☐
11.30. Exame dos pés	(1) Sim (2) Não (9) Não consta	☐
11.31. Pé Diabético	A. Úlceras (1) Sim (2) Não (9) Não consta B. Amputações (1) Sim (2) Não (9) Não consta C. Artropatia de Charcot (1) Sim (2) Não (9) Não consta	A. ☐ B. ☐ C. ☐
11.32. Arteriopatia periférica	A. Ausência pulsos m.inferiores (1) Sim (2) Não (9) Não consta B. Sopro carotídeo (1) Sim (2) Não (9) Não consta C. Amputações (1) Sim (2) Não (9) Não consta	A. ☐ B. ☐ C. ☐
11.33. Doenças autoimunes	A. Tiroidite de Hashimoto (1) Sim (2) Não (9) Não consta B. Moléstia de Basedow-Graves (1) Sim (2) Não (9) Não consta C. Doença celíaca (1) Sim (2) Não (9) Não consta D. Adrenalite (1) Sim (2) Não (9) Não consta E. Miastenia gravis (1) Sim (2) Não (9) Não consta F. Ooforite (1) Sim (2) Não (9) Não consta G. Artrite Reumatóide (1) Sim (2) Não (9) Não consta H. Lupa Eritematoso Disseminado ... (1) Sim (2) Não (9) Não consta I. Alopecia (1) Sim (2) Não (9) Não consta J. Vitiligo (1) Sim (2) Não (9) Não consta K. Outras (especifique) (1) Sim (2) Não (9) Não consta _____	A. ☐ B. ☐ C. ☐ D. ☐ E. ☐ F. ☐ G. ☐ H. ☐ I. ☐ J. ☐ K. ☐
11.34. Doença Periodontal	(1) Sim (2) Não (9) Não consta	☐

12. Exames laboratoriais: informações obtidas no prontuário do paciente

12.1. DATA: DIA / MÊS / ANO (caso não tenha o dia, completar com Mês / Ano e, se não tiver o Mês, completar apenas com o Ano)	/ /			
Exame	Consta no prontuário?	Quantos exames fez no último ano?	Valor de último resultado	Unidade de medida
12.2. Hemoglobina Glicada	(1) Sim (2) Não A. ☐	B.	C.	Valor referência do Método D. Mínimo E. Máximo

12.3. Glicemia de jejum	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.4. Glicemia pós-prandial	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.5. Frutosemina	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.6. Colesterol total	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.7. Triglicerídeos	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.8. HDL	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.9. LDL	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.10. Creatinina	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.11. Uréia	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl (2) mmol/l ☐
12.12. Transaminase oxalacética	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) U /ml ☐
12.13. Transaminase pirúvica	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) U/ml ☐
12.14. Creatino Fosfoquinase	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) U/ml ☐
12.15. K	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mEq ☐
12.16. Na	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mEq ☐
	(1) Sim	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl

12.17. P Creativa ultrasensível	(2) Não A. ☐			(2) mg/l ☐
12.18. Ácido úrico	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mgdl ☐
12.19. TSH	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) mUI/ml ☐
12.20. Peptídio C	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) ng/ml ☐
12.21. Anticorpo AntiGAD	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) UI/ml ☐
12.22. Anticorpo Antiinsulina	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) UI/ml ☐
12.23. Anticorpo Antiilhota	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) UI/ml ☐
12.24. Anticorpo Antitirosina fosfatase	(1) Sim (2) Não A. ☐	B. ☐ ☐	C. ☐ ☐ ☐	D. ☐ (1) UI/ml ☐

C: Hora do término da entrevista: ☐ ☐ : ☐ ☐

Horas minutos

ANEXO C

CARACTERIZAÇÃO DO DOENTE COM DIABETES TIPO MODY

1. **Nome:** _____2. **Sexo:** ___ Masculino ___ Feminino3. **Código do doente-alvo*:** _____

□□* 11 dígitos = Data de nascimento: dia (2 dígitos) + mês (2 dígitos) + ano (4 dígitos) ; Iniciais do primeiro

e último nome do doente (2 dígitos) ; Inicial da localidade onde se localiza o Centro (1 dígito) . P.ex.: Maria João Faro Sousa,

nascida a 2 de Julho de 1960 e seguida no Hospital de S. João – Porto, teria o código **0 2 0 7 1 9 6 0 M S P** □4. **Naturalidade:** _____5. **Data de Nascimento:** ____ / ____ / ____6. **Idade de diagnóstico da diabetes:** _____ anos7. **Terapêutica antidiabética efetuada, atualmente:**

___ Insulina: _____

___ Antidiabéticos orais: _____

8. **Determinações analíticas** (valor e data da última análise):a. **HbA1c:** _____ % (/ /) b. **Glicemia jejum:** _____ mg/dl (/ /)c. **Triglicerídios:** _____ mg/dl (/ /) d. **Colesterol total:** _____ mg/dl (/ /)e. **HDL-c:** _____ mg/dl (/ /) f. **LDL-c:** _____ mg/dl (/ /)g. **Creatinina:** _____ mg/dl (/ /) h. **Uréia:** _____ mg/dl (/ /)i. **Microalbuminúria:** _____ [g/min ou _____ mg/24h (/ /)j. **Proteinúria:** _____ (/ /) l. **Péptido C plasmático:** _____ (/ /)9. **Complicações tardias da diabetes?**

___ Não ___ Sim;

Quais:

__Nefropatia __Neuropatia periférica __Neuropatia autonômica

__Retinopatia __Doença vascular periférica

__Acidente vascular cerebral __Coronariopatia isquêmica:

Outras: _____

10 **Patologias concomitantes** (e terapêuticas efetuadas):

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL

PROJETO DE MESTRADO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar:

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Presidente Dutra

Rua Barão de Itapary s/n Centro

CEP: 65020-070

Fone: (98)- 3219-1000

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

MODY EM PACIENTES ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE DIABETES TIPO 1 DO
HUUFMA EM SÃO LUÍS – MA

Este estudo se destina a investigar a existência de um tipo diferente de Diabetes mellitus, que pode acometer toda uma família e pode ser tratada de forma a se prevenir complicações crônicas típicas do diabetes. Este estudo é importante porque vai determinar o número de pacientes com este tipo de diabetes, assim encaminhando-os para tratamento adequado. Este estudo começará em setembro de 2009 e terminará em janeiro 2011.

Ele será realizado da seguinte maneira: será realizada coleta de sangue dos participantes no laboratório do HUUFMA e INLAB para análise dos níveis de várias substâncias no organismo relacionado ao diabetes. Existe um pequeno incômodo no momento da coleta do exame, pela picada da agulha.

O risco de infecção é desprezível, pois a coleta de sangue será realizada por profissionais habilitados e com materiais descartáveis do próprio hospital. Você contará com a assistência do pesquisador se necessário, em todas as etapas de sua participação no estudo.

Os benefícios que você deverá esperar com a sua participação, mesmo que indiretamente serão: melhor avaliação de diabetes tipo 1 com capacidade de citar prognóstico em alguns

casos e descoberta de casos entre familiares os quais poderão ser encaminhados para tratamento com especialista.

Sempre que você desejar será fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, você poderá se recusar a continuar participando do estudo e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que para isto sofra qualquer penalidade ou prejuízo, ou seja, sem qualquer alteração na continuidade de seu acompanhamento médico.

Será garantido o sigilo quanto sua identificação e das informações obtidas pela sua participação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Você não terá qualquer despesa para sua participação.

Prof. Dra. Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal Mesquita

Dra. Ana Gregória Ferreira P. de Almeida

CRM – 3986 – MA

São Luis, ____/____/____

Assinatura do sujeito ou responsável

Endereço do sujeito : _____

Em caso de dúvidas, esclarecimentos ou reclamações:

Pesquisador Dra. Ana Gregória Ferreira Pereira de Almeida

Endereço: Avenida Barã de Itapary s/n

Telefone: (98) 32258558

APÊNDICE B

PROTOCOLO:

EXTRAÇÃO DE DNA POR BUFFY COAT:

- Identificar os tubos de microcentrifuga (eppendorfs) com as iniciais dos pacientes e/ou doadores.
- Transferir 250 µL de buffy coat para os eppendorfs previamente identificados conferindo atentamente os nomes.

LISE DOS GLÓBULOS VERMELHOS:

- Adicionar 500 µL da solução de RCBL e homogeneizar bem a amostra no vortex;
- Centrifugar a 900 RPM por 3 minutos;
- Descartar o sobrenadante cuidando para não perder o pellet;
- Adicionar 500 µL da solução de RCBL e homogeneizar bem a amostra no vortex;
- Centrifugar a 900 RPM por 3 minutos;
- Descartar o sobrenadante cuidando para não perder o pellet;

Obs. Se o pellet não estiver limpo repetir a lavagem com RCBL mais uma vez.

- Acrescentar 750 µL de RCB e homogeneizar as amostras no vortex;
- Centrifugar a 900 RPM por 3 minutos;
- Descartar o sobrenadante cuidando para não perder o pellet.

Obs. Se o pellet não estiver limpo repetir a lavagem com RCB mais uma vez, não excedendo duas lavagens.

PURIFICAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DO DNA

- Acrescentar 500 µL de EZ-DNA e agitar no vortex por dois minutos;
- Deixar a amostra em repouso por cinco minutos a temperatura ambiente;
- Acrescentar 500 µL de Etanol Absoluto gelado e homogeneizar lentamente e por inversão até formar uma única solução e aparecer o DNA em formato de medusa;
- Deixar em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente;
- Centrifugar a 900 RPM por 3 minutos;
- Descartar o sobrenadante cuidando para não perder o pellet;
- Acrescentar 500 µL de Etanol 96° gelado;
- Soltar o pellet com leves batidas no fundo do tubo;
- Centrifugar a 900 RPM por 3 minutos;
- Descartar o sobrenadante cuidando para não perder o pellet;
- Deixar os tubos de boca para baixo em papel toalha;

- Colocar em banho seco a 65° por 30 segundos;
- Acrescentar 210 µL de água ultra pura ou água de injeção para hidratar;
- Deixar em banho seco a 65° por 1 hora com as tampas abertas;
- Fechar os tubos;
- Etiquetar as amostras conferindo os nomes;
- Deixar ressuspendendo a temperatura ambiente por 24 horas;
- Armazenar os tubos em freezer-20°;
- Limpar a bancada e repor o material usado.

APÊNDICE C

PURIFICAÇÃO – PRODUTO DE PCR

- Misturar o volume da PCR (10 µl) com o dobro de Buffer NT (20 µl) em um eppendorf;
- Transferir o volume para o tubo de coluna e colocar dentro do tubo de coleta (2 ml).Centrifugar por 2 min.Descartar o flow – through;
- Adicionar 700 µl de Buffer NT3 e centrifugar por 2 min. Descartar;
- Centrifugar por 3 min para remover o Buffer NT3. Jogar fora o tubo de coleta;
- Colocar o tubo de coluna dentro de um eppendorf. Adicionar de 15-50 µl (45 µl) do Buffer NE esperar por 1 min a temperatura ambiente e centrifugar por 2 min.

PURIFICAÇÃO – GEL

- Adicionar em um eppendorf 100mg de gel com 200 µl de Buffer NT. Colocar em banho Maria por 10 minutos e depois vortexar;
- Transferir o volume para o tubo de coluna e colocar dentro do tubo de coleta (2 ml).Centrifugar por 2 min.Descartar o flow – through;
- Adicionar 700 µl de Buffer NT3 e centrifugar por 2 min. Descartar;
- Centrifugar por 3 min para remover o Buffer NT3. Jogar fora o tubo de coleta;
- Colocar o tubo de coluna dentro de um eppendorf. Adicionar de 15-50 µl (45 µl) do Buffer NE esperar por 1 min a temperatura ambiente e centrifugar por 2 min.

A especificidade dos *primers* utilizados foi confirmada por reação de PCR convencional que tiveram seus produtos submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% com posterior coloração com brometo de etídeo e demonstram a presença de uma única banda para cada exon (Figuras 6 e 7).

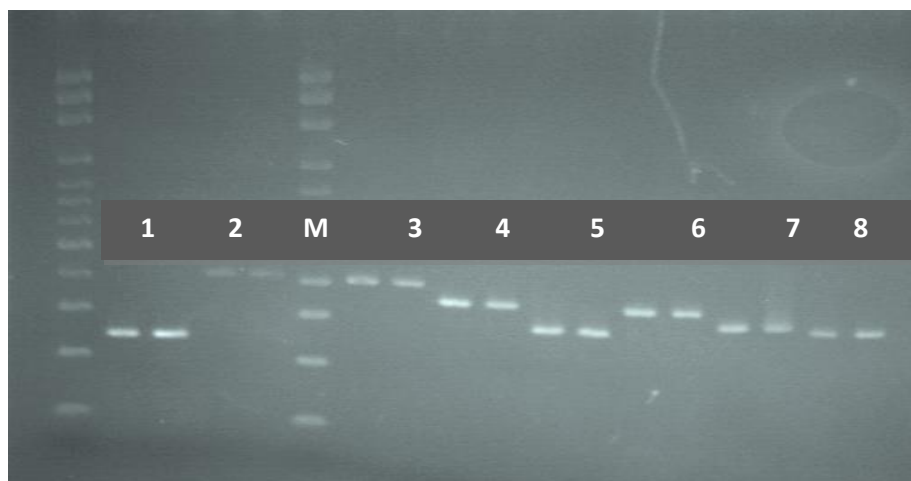


Figura 24: *Check Gel* dos produtos de PCR dos éxons 1, 2, 3, 4, 5,6, 10 e promotor 1 do gene *HNF 1A*. Com 248pb, 415pb, 415pb, 366pb, 304pb, 360pb, 321pb e 322pb respectivamente. M: marcador de 100 pb. Corado com brometo de etídio.

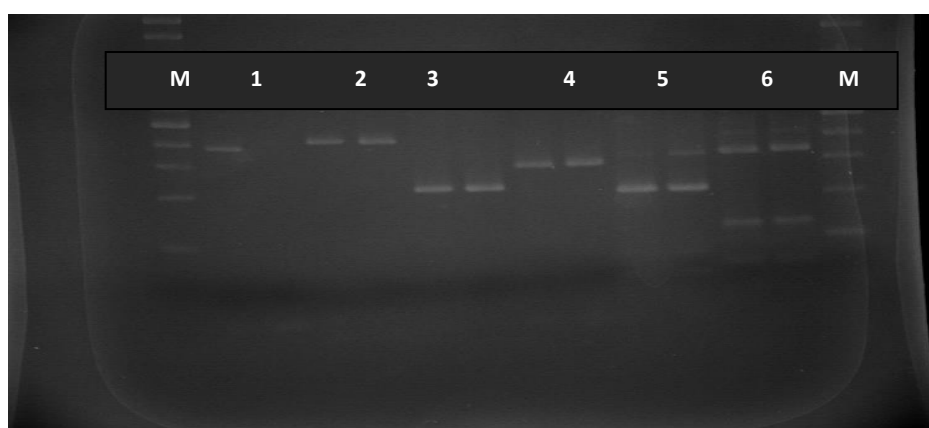


Figura 25: *Check Gel* dos produtos de PCR dos éxons 7, 8, 9, 10, promotor 1e promotor 2 *HNF 1A*. Com 321 pb, 229 pb, 318 pb, 248 pb, 415 pb e 388 pb respectivamente. M: marcador de 100 pb. Corado com brometo de etídio.

6. PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

6.1. Diabetes care A1

6.2. Normas editoriais

1. ABOUT THE JOURNAL

Diabetes Care is a journal for the health care practitioner that is intended to increase knowledge, stimulate research, and promote better management of people with diabetes. To achieve these goals, the journal publishes Original Articles on human studies in the following categories:

- 1) Clinical Care/Education/Nutrition/Psychosocial Research
- 2) Epidemiology/Health Services Research
- 3) Pathophysiology/Complications
- 4) Cardiovascular and Metabolic Risk

The journal also publishes clinically relevant review articles, letters to the editor, and commentaries. Topics covered are of interest to clinically oriented physicians, researchers, epidemiologists, psychologists, diabetes educators, and other health professionals. The journal does not publish descriptions of study designs without data, papers on in vitro studies, or studies involving animals.

The editor-in-chief of *Diabetes Care*, William T. Cefalu, MD, began his term with the January 2012 issue. Dr. Cefalu's editorial team began reviewing first submissions on July 1, 2011.

2. POLICIES

The American Diabetes Association's Publications Policy Committee follows the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), the World Association of Medical Editors (WAME), and the Committee on Publication Ethics (COPE) for guidance on policies and procedures related to publication ethics. The policies for *Diabetes Care* have been adopted from those three advisory bodies and, where necessary, modified and tailored to meet the specific content, audiences, and aims of *Diabetes Care*. Comprehensive information related to the editorial and ethical policies of *Diabetes Care* can be found in

[Publication Policies and Procedures for *Diabetes Care*](#). The Association's Publications Policy Committee or Subcommittee on Ethical Scientific Publications will consider on a case-by-case basis policies that are not addressed in the policies document, which contains information related to the following topics:

- Study Design
- Originality and Prior Publication
- Authorship and Contributions
- Acknowledgments
- Conflict of Interest
- Data Access and Responsibility
- Clinical Trials, Systematic Reviews, and Meta-Analyses
- Plagiarism
- Digital Image Manipulation
- Responses to Possible Scientific Misconduct
- Peer Review
- Editorial Decisions
- Prepublication of Accepted Articles
- Reuse, Post-Prints, and Public Access
- Errata
- Media Embargos
- Advertising
- Supplements

Frequently referenced segments of the document appear below.

2.1. *Diabetes Care*

Publishes only material that has not been published previously (either in print or electronically) and is not under consideration for publication elsewhere, with the exception of an abstract that is less than 400 words in length. Prior presentation of data (e.g., at a scientific meeting or via webcast) does not preclude publication in *Diabetes Care*, but should be disclosed in the Acknowledgments of the paper and in the author's comments to the editor upon manuscript submission. All submissions to the journal will be scanned for possible duplicate or prior publication using the

CrossCheck/iThenticate plagiarism detection system (www.ithenticate.com). Any article that eclipses a certain similarity threshold with another article will be closely reviewed by ADA. Authors who submit previously published work to the journal will be banned from submitting future manuscripts to the journal, and their funding body and/or institution will be notified.

2.2. Prepublication of Research Articles.

To make new research readily available to subscribers, *Diabetes Care* publishes original research articles online ahead of print before the print/online issue becomes available.

Online Ahead of Print articles are citable by their unique DOI (digital object identifier). DOIs for *Diabetes Care* articles begin with 10.2337, followed by the article number assigned when the manuscript was submitted online via the manuscript submission system. (e.g., 10.2337/dc13-1234)

Example: Kohler C, Norton H, Such V, Baldino N: How to cite a prepublished article in ADA journals. *Diabetes Care* 10.2337/dc13-1234. Accessed [insert date]

3.3. Embargo Policy.

If you are interested in reporting on a *Diabetes Care* article published online ahead of print, please read the [article embargo policy](#) for specific instructions and conditions. Articles that were not prepublished are embargoed until they appear in a final issue of *Diabetes Care Online*.

3.4. Public Access Policy.

Since the July 2008 issue, the American Diabetes Association deposits all final print articles accepted for publication in *Diabetes Care* in PubMed Central, a repository of peer-reviewed research maintained by the National Institutes of Health and its affiliates. ADA provides this service at no cost to authors. Articles are accessible on PubMed Central 12 months after the date of final publication in *Diabetes Care*. Authors may submit the accepted version of their *manuscript* to their funding body's repository immediately upon acceptance.

3.5. Clinical Trials.

The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) defines a clinical trial as “any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes.” All clinical trials submitted to *Diabetes Care* must be registered with an approved ICMJE clinical trial registry (ClinicalTrials.gov, www.ISRCTN.org, www.actr.org.au, www.umin.ac.jp, and www.trialregister.nl). *Diabetes Care* accepts registration of clinical trials in any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trial Registry Platform](http://WHOInternationalClinicalTrialRegistryPlatform). Posting clinical trial results exceeding more than 500 words in a clinical trials registry is considered prior publication. Posting results in the form of a structured abstract (less than 500 words) or table is not considered prior publication. For definitions and further information, please see ICMJE’s clinical trials registration policy found in the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](http://UniformRequirementsforManuscriptsSubmittedtoBiomedicalJournals). Please be sure to include the unique trial number and the name of the registry (e.g., NCTXXXXXXXX, ClinicalTrials.gov; or ISRCTNXXXXXXXX, www.ISRCTN.org) on the manuscript's title page.

3. EDITORIAL OFFICE CONTACT INFORMATION

Diabetes Care Editorial Office
5110 Commerce Square Dr., Suite G
Indianapolis, IN 46237
phone: (317) 354-1508, ext 1782 fax: (317) 859-3592
e-mail: diabetescare@diabetes.org

Lyn Reynolds, Director, Editorial Office
Shannon Potts and Jane Lucas, Peer Review Managers
Rita Summers, Editorial Assistant
Joan Garrett, Editorial Assistant
Rachel Castillo, Editorial Secretary

4. FORMS AND REQUIREMENTS

4.1. The [Manuscript Submission Form](#) addresses ADA’s policies on 1) originality and authorship, 2) copyright assignment, and 3) potential conflict of interest and

outlines the Association's permission policies related to reuse and post prints. ADA will also accept ICMJE's [Uniform Disclosure Form for Potential Conflicts of Interest](#). The corresponding author may complete the form on behalf of all authors.

Corresponding authors are encouraged to scan and upload the form to the manuscript submission site with their article files. If this is not possible, the corresponding author may fax (317-859-3592) or e-mail (EditorialOffice@diabetes.org) the completed form for all authors to the Editorial Office immediately after submission. Submissions will not be considered complete until the form has been received.

4.2. Statement of Originality and Authorship.

Diabetes Care subscribes to the requirements stated in the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#) that authorship implies substantial contributions to conception and design or analysis and interpretation of data and drafting of the article or critical revision for important intellectual content. The editor reserves the right to query authorship contribution.

4.3. Author Contributions.

Authors are required to include a paragraph in the Acknowledgments section listing each author's contribution.

4.4. Writing Groups.

The names of members of writing groups should be listed at the end of the paper in the Acknowledgments section (if no more than two or three short paragraphs) or in a separate supplemental online-only file.

4.5. Affiliations.

Institutional and/or employment affiliations of all authors should be listed on the title page of the manuscript. In addition, when citing "editorial assistance" or help provided by a colleague, authors are required to list the employer/institution with which that colleague is affiliated.

Example: “The authors acknowledge the editorial assistance of Mark Smith, Global Informatics, Inc.”; “The authors thank Mark Smith, Global Informatics, Inc., for help with preparing the manuscript.”

4.3. Copyright Assignment.

The American Diabetes Association holds the copyright on all material appearing in *Diabetes Care*, unless the content is produced by an employee of the U.S. government as part of the authors’ official duties. Authors must check the appropriate boxes and sign the Manuscript Submission Form, which transfers copyright to the ADA in accordance with the Copyright Revision Act of 1976.

4.4. Reuse.

Authors are permitted to reuse portions of their ADA-copyrighted work in their own work, including tables and figures, and to reuse portions or all of their ADA-copyrighted work for lecture or classroom purposes, provided that the proper citation and copyright information is given.

4.5. Post-Prints.

Authors are permitted to submit the accepted version of their *manuscript* to their funding body or institution for inclusion in that funding body or institution’s database, archive, or repository, or to post the accepted version on their personal Web site. These manuscripts may be made freely accessible to the public upon acceptance, provided that the following two conditions are observed:

First, post-prints must include the following statement of provenance and, once the final version has been published in the journal, a link to the final published version of the paper on the journal's Web site:

This is an author-created, uncopyedited electronic version of an article accepted for publication in *Diabetes Care*. The American Diabetes Association (ADA), publisher of *Diabetes Care*, is not responsible for any errors or omissions in this version of the manuscript or any version derived from it by third parties. The

definitive publisher-authenticated version will be available in a future issue of *Diabetes Care* in print and online at <http://care.diabetesjournals.org>.

Second, the version of the manuscript deposited or posted must be identical to the final accepted version, with the exception of the addition of the above statement and any changes necessary to correct errors. Authors may make changes to the posted version to correct mistakes or may issue an erratum at any time. However, the final published version of the manuscript may not be deposited, posted, or later substituted for the post-print.

4.6. Conflict of Interest.

Authors must read the [ADA Policy Statement on Duality of Interest](#) and check the appropriate box on the [Manuscript Submission Form](#).

4.7. Color Figure Approval.

For a manuscript that contains color figures and is accepted for publication, the corresponding author must complete a color printing approval form. Forms are available online through the manuscript submission process. The cost of printing in color, to be borne by the author, is \$490 U.S. per color figure. Color fees are based on individual figures as a whole, not by the part, i.e., A, B, C, etc. Authors will receive an invoice for publication fees when page proofs become available.

5. MANUSCRIPT CATEGORIES

See Section 6, [Manuscript Format and Style](#), for detailed instructions on formatting documents.

5.1. Original Articles.

Original Articles should be arranged in the following order: title page, structured abstract, introduction (no heading), “Research Design and Methods,” “Results,” “Conclusions,” “Acknowledgments,” “References,” tables, and figure legends.

A **structured abstract** is required for all Original Articles.

An abstract for an Original Article should not exceed 250 words. (This is not to be confused with abstracts submitted to the Annual Scientific Meeting, for which the word limit is higher.) The abstract must be self-contained and clear without reference to the text and should be written for a general journal readership. The abstract format should include four sections: “Objective” (the purpose or hypothesis of study), “Research Design and Methods” (the basic design, setting, number of participants and selection criteria, treatment or intervention, and methods of assessment), “Results” (significant data found), and “Conclusions” (the validity, limitations, and clinical applicability of the study and its results).

The **word count limit** for Original Articles is 4,000 words, excluding words in tables, table legends, figure legends, title page, acknowledgments, and references. In addition, an original article is limited to a combination of 4 tables and figures. **References** are limited to 40 citations.

In the case of **multicenter studies**, authors should provide a list of participating investigators in an appendix to the paper. Papers will not be reviewed if this information is not included.

Where appropriate, **clinical and epidemiological studies** should be analyzed to see if there is an effect of sex or ethnicity. If there is no effect, it should be stated as such in the “Results” section.

Randomized Clinical Trial reporting: Authors of reports on randomized controlled trials are required to use the instructions and checklist in the [Consolidated Standards of Reporting Trials \(CONSORT\) Statement](#). The instructions and checklist are designed to ensure that information pertinent to the trial is included in the study report. CONSORT information may be included in a supplemental online-only file so that it does not affect word count limitations.

All **clinical trials** submitted to *Diabetes Care* for consideration of publication must be registered with a clinical trial registry approved by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Please see Section 2.5 for more information.

5.2. Brief Reports.

Brief Reports will be considered in one of two specific formats, as follows:

1. Clinical research related to:
 - the feasibility of a "proof of concept" principle or idea;
 - a novel or innovative finding considered as a pilot study when planning for a larger trial; or
 - Results from early phase human investigation from a small number of subjects.

This format includes a structured abstract stating the study's objectives, followed by a short introduction (2 to 3 sentences) and four concise sections: Research Design and Methods, Results, Conclusions, and References.

The abstract must be self-contained and concise, without reference citations, and written for a general journal readership.

2. A case report/case study representing a unique or novel finding on disease presentation or treatment effects.

The format of a case report/case study consists of a structured abstract, followed by a short introduction (2 to 3 sentences) and four sections: History and Examination, describes the patient and provides a brief history; Investigation, discusses the treatment findings and results; Conclusions, summarizes the importance of the findings/results in one or two paragraphs; and References.

Brief Reports are not intended to be short reports on studies that are not powered for larger trials or to simply confirm findings from other studies.

Brief Reports may contain one table or one figure only.

The format of title page, margins, text, table, figure, and font size for Brief Reports is the same as for Original Articles.

Manuscripts should be double spaced, written in Arial or Times New Roman 12 point font, and saved as a .doc, .txt, or .rtf file. See Sections 6.2 and 6.3 of Manuscript Format and Style.

Brief Reports should include no more than 15 references.

The word limit for a Brief Report is 1,150 words, including the 150 word abstract. Not included in the word count are the tables, figures, legends, the title page, acknowledgments, and references.

5.3. Letters to the Editor.

Letters do not have abstracts, should not exceed 500 words (excluding a maximum of 5 references), and do not have tables or figures. As with all submissions, letters should be double-spaced and include a title page.

A Comment Letter is a letter that comments on a recently published article and should include the cited paper as reference 1 in the reference list. It should be submitted within 3 months of the article's printed publication.

A Response Letter is an invited letter from the cited author that replies to the comment letter and should include the comment letter as reference 1 in the reference list.

All letters require a signed Manuscript Submission Form from the author(s). A conflict-of-interest statement for all authors must be included in the Acknowledgments section of the main document. If there are no relevant conflicts of interest to disclose, authors should indicate as such in the Acknowledgments section.

5.4. Commentaries.

Diabetes Care publishes Commentaries by invitation only. Commentaries normally accompany an original article and are invited by the editors. Instructions will be provided at the time of solicitation. As with any submission, commentaries should include a title page and be double-spaced. A commentary is limited to 1,200 words and 25 references, and it should not include an abstract.

5.5. Review Articles and Meta-analyses.

Please read the [criteria and formatting guidelines for meta-analyses and systematic review articles](#). While a meta-analysis may be submitted to the journal with prior approval from the editors, review articles are only published in *Diabetes Care* if they have been invited or approved by the editors prior to submission. If you would like to submit an uninvited review article, you must first submit a proposal to the editors.

The proposal should include: 1) a detailed outline of the content of the proposed review; 2) a general idea of the amount of original literature to be summarized; and 3) the background of the author(s) and a description of expertise in the area to be discussed in the review. It is anticipated that the author(s) will have worked and published in the area covered by the review. The author should also state why he/she feels this particular review is suited for *Diabetes Care* and why the review would appeal to the readership.

Lastly, the authors must disclose whether they propose to write the entire article themselves, whether they received any form of sponsorship or honorarium for the material, and whether a pharmaceutical company, or its representative, was involved in the funding or authorship. Once approved, Review Articles are limited to 5,000 words, 60 references, and an unstructured 250-word abstract. Review Articles do not have abstracts.

5.6. Editorials.

Editorials are accepted by invitation only from the Editorial Committee. As with all submissions, an editorial must include a title page and authors must provide a signed Manuscript Submission Form. The word limit for an Editorial is 1,500 words, not including references. Editorials normally do not contain figures or tables. A conflict-of-interest statement for all authors should be included at the end of the text or the Acknowledgments section, if one is included. Please label this section "Disclosure." If the authors have no relevant conflict of interest to disclose, please indicate so in this section.

5.7. Supplements.

Supplements must be approved prior to submission. A proposal for a supplement should first be submitted to the Publications Department of the ADA (ckohler@diabetes.org) and must specify the following:

- The name of the organization(s) sponsoring and funding the supplement (not merely the name of the public relations agency handling its publication).
- If the supplement is based on a symposium, where and when the symposium was held and how the speakers and papers were selected.
- Whether authors will be paid and, if so, how much.

If the proposal is approved, it will be forwarded to the Editor of *Diabetes Care*. Initial approval by the ADA does not commit the Editor to accept a proposal in whole or part. All manuscripts are subject to the same peer review as other manuscripts in the journal.

6. MANUSCRIPT FORMAT AND STYLE

Articles must be in clear and understandable English. Non-native English authors are encouraged to seek the assistance of an English-proficient colleague, or a communications agency, such as [American Journal Experts](#), to help improve the clarity and readability of a paper before it is submitted to the journal.

6.1. Title Page.

Every manuscript, regardless of article type, must have an accompanying title page. In addition to the title, the title page should include a short running title (less than 47 characters and spaces combined); the first name, middle initial, last name, and highest academic degree of each author; affiliation (in English) of each author during the time the study was conducted; name, current address, telephone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author; and the word count and number of tables and figures.

6.2. Main Document.

The main document file includes the title page, abstract, main text, acknowledgements, figure legends, references, and tables. Please do not use headers, footers, or endnotes in your paper.

The Main Document should be in Word document format (not as a PDF). This will allow our Editorial Office to verify the word count and our production staff to turn your paper (if accepted) into an article.

6.3. Text Composition.

Articles should be written in clear, concise English following the recommendations for scientific writing found in *Scientific Style and Format*, the Council of Science Editors (CSE) style manual (7th ed., 2006, Reston, VA, Council of Science Editors). All accepted manuscripts will be edited according to the CSE style manual and *The Chicago Manual of Style* (16th ed., 2010, Chicago, IL, The University of Chicago Press) by ADA professional publications staff.

The designations *type 1 diabetes* and *type 2 diabetes* should be used when referring to the two major forms of diabetes. Abbreviations for diabetes, such as T2D for *type 2 diabetes*, should not be used. The term *diabetic* should not be used as a noun.

All manuscripts should be double-spaced, in Arial or Times New Roman 12-point font, and saved as a .doc, .txt, or .rtf file. In addition, please do not "lock" or "page protect" your document, and avoid using footnote and endnote functions.

6.4. Abbreviations and Units.

Abbreviations should be used only when necessary, e.g., for long chemical names (HEPES), procedures (ELISA), or terms used throughout the article. See the [list of abbreviations](#) that need not be defined; all others must be defined at first use. Abbreviate units of measure only when used with numbers. Abbreviations may be used in tables and figures. The CSE style manual contains lists of standard scientific abbreviations.

Clinical laboratory values and units should be in [Système International \(SI\)](#) form. Kilocalories should be used rather than kilojoules. Glycated hemoglobin should be expressed as percentage of total and as standard deviation from mean control levels.

6.5. Font.

Text, including title and author names, should be in 12-point Arial or Times New Roman. Please avoid using boldface font. Text in tables should be no smaller than 10-point font.

6.6. Margins.

Margins should be 1" at the top and bottom and 1" on the left and right sides.

6.7. Acknowledgments.

The acknowledgments are located after the main text and before the reference list. Acknowledgments should contain the author contributions paragraph, brief statements of assistance, the guarantor's name (person[s] taking responsibility for the contents of the article), funding/financial support, and reference to prior publication of the study in abstract form, where applicable.

6.8. References.

The reference list should go at the end of the document, after the main text and acknowledgments (if applicable) and before the tables. Original Articles are limited to 40 references. Letters are allowed 5 references. Review Articles are allowed 60 references, and meta-analyses should have no more than 40 references.

6.9. Supplemental Data.

Non-essential tables and figures may accompany articles as online-only supplemental files, but authors are asked to include a comment to the editor at the time of manuscript submission that explains the rationale and justification for submitting and possibly posting the supplemental materials.

Lists that include names of **principal investigators or writing groups** may also be submitted as online-only supplements if they exceed 150 words. Otherwise, the names of principal investigators or writing groups should be listed in an appendix at the end of the main document, before the references.

6.10. Tables.

Each table should be inserted on a separate page at the end of the document with the table number, title, and legend indicated. Table legends should be inserted below the table and should not be included inside the table. Tables should be created using Word and the "Insert Table" command. Please use Arial or Times New Roman font, no smaller than 10-point.

6.11. Figures.

Diabetes Care uses digital publishing methods throughout the journal production process. If your article is accepted, it will be published in both the print and online journal. The following sections provide information on how to format your figures to ensure the best possible reproduction of your images.

Size. Figures should be produced at the size they are to appear in the printed journal. Please make sure your figures will fit in one, two, or three columns in width. Multi-paneled figures should be assembled in a layout that leaves the least amount of blank space.

1	column	=	13	picas	wide,	2.2	in,	5.6	cm
2	columns	=	28	picas	wide,	4.6	in,	11.7	cm
3 columns = 41 picas, 6.8 in, 17.3 cm									

Font. At 100% size, fonts should be 8-10 points and used consistently throughout all figures.

Text. Information on the axes should be succinct, using abbreviations where possible, and the label on the y-axis should read vertically, not horizontally. Key information should be placed in any available white space **within** the figure; if space is not available, the information should be placed in the legend. In general, figures

with multiple parts should be marked A, B, C, etc., with a description of each panel included in the legend rather than on the figure.

Line and bar graphs. Lines in graphs should be bold enough to be easily read after reduction, as should all symbols used in the figure. Data points are best marked with the following symbols, again assuring that they will be readily distinguishable after reduction: ○ ● □ ■ △ ▲. In the figure legend, please use words rather than the symbols; e.g., "black circles = group 1; white squares = group 2; black bars = blood glucose; white bars = C-peptide."

Formatting digital figures files for print and online reproduction. To meet ADA's quality standards for publication, it is important to submit digital art that conforms to the appropriate resolution, size, color mode, and file format. Doing so will help to avoid delays in publication and maximize the quality of images, both online and in print. **Reproductions.** If materials (e.g., figures and/or tables) are taken from other sources, the author must provide written permission for reproduction from the original publisher and author at the time of submission. In addition, the source should be cited at the end of the figure legend.

Digital image manipulation. The American Diabetes Association has adopted the statement developed by the [Journal of Cell Biology](#) as its policy on the manipulation of digital images:

7. SUBMITTING A MANUSCRIPT

Please read the complete instructions for authors before submitting your manuscript to *Diabetes Care* via <http://mc.manuscriptcentral.com/diabetescare>.

Your manuscript should be submitted under the user account of the designated **corresponding author** (the contact person listed on the title page of the manuscript).

In the File Upload Center, you will be able to browse your computer for the files associated with your manuscript. When you upload each file, be sure to choose a designation from a pull-down menu that describes the file content (e.g., "Main

Document,” “Figure,” “Table,” etc.). In addition, please make sure each file name clearly describes its content (e.g., “figure1.jpg,” “table2.doc,” “coverletter.doc,” etc.).

The system automatically converts files to PDF files. Please do not upload PDF files except for signed Manuscript Submission Forms. Also, please do not upload zip or PowerPoint files.

8. ACCEPTED MANUSCRIPTS

To make new research readily available to subscribers, *Diabetes Care* publishes original research articles online ahead of print. For detailed information on publish-ahead-of-print articles, see Section 2.2 of [Policies](#).

The designated corresponding author will receive notification of availability of page proofs by e-mail. Corrections should be returned to the Editorial Manager (see contact info below) by fax or e-mail within 24 hours of receipt of the proof. Failure to do so may delay the publication of the article.

Correspondence concerning the copyediting and proofreading of accepted manuscripts should be addressed to Valentina Such, Editorial Manager, Diabetes Care, American Diabetes Association, 1701 North Beauregard St., Alexandria, VA 22311; tel: 703-299-2083; fax: 703-253-4870; e-mail: vsuch@diabetes.org.

Correspondence concerning the production of accepted articles and availability of page proofs should be addressed to Amy Gavin, Production Manager, American Diabetes Association, 1701 North Beauregard St., Alexandria, VA 22311; tel: 703-299-2033; fax 703-253-4870; e-mail: agavin@diabetes.org.

9. FINANCIAL OBLIGATIONS

Page charges are assessed for non-invited articles to help defray the costs of publication. The charge is \$90 per page. As noted under [Color Figure Approval](#) (Section 4.5.), each color figure printed will incur a charge of \$490. The corresponding author will receive via e-mail a pro forma invoice, as well as a reprint order form, when page proofs become available. Unless otherwise indicated, ADA will assume that the corresponding author is taking responsibility for payment.

6.3. Artigo propriamente dito

***HNF1A* gene mutations in Brazilian patients diagnosed with type1 diabetes**

Ana Gregória Ferreira Pereira de Almeida¹, Bruno de Almeida Nunes², Fernanda Oliveira Graça³, Manuel dos Santos Faria⁴, Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal Mesquita⁵

1. Master's in Maternal-infant health, Federal University of Maranhão (Universidade Federal do Maranhão), São Luis, Brazil.
2. Master's in Maternal-infant health, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.
3. Student of biological sciences, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.
4. PhD in Endocrinology, Head of Endocrinology, Maranhão Federal University Hospital, São Luis, Brazil.
5. PhD in genetics, Head of the Genomic Studies Laboratory, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.

Corresponding author:

Ana Gregória Ferreira Pereira de Almeida

Rua 21 Quadra 24 n – 01 Cohab Anil IV

São Luis – Maranhão

Brazil

CEP: 65053-430

Tel.: +55 98 32695586/ + 55 98 9112 3519

E-mail: agfpalmeida@hotmail.com

Running title: ***HNF1A* gene mutations in Brazilian patients**

Word count: 5541

of tables: 4

of figures: 1

Abstract

Objective: The objective of this research was investigate *HNF1A* mutations in type 1 diabetes outpatients and epidemiologically characterize the study population and correlate mutations with clinical presentation. **Research design and methods:** We evaluated 60 patients who had previously received a diagnosis of type 1 diabetes; 20 patients with clinical characteristics typical of maturity-onset diabetes of the young (MODY) were included in the *HNF1A* molecular analysis by genetic sequencing. **Results:** The study included 11 female and 9 male patients, with an average age at diagnosis of 24.3 ± 6.9 years, a BMI of 24.76 ± 4.7 kg/m², and a GHb of 6.98 ± 1.45 ; the patients used an average total insulin dose of 0.58 ± 0.31 IU/kg/day. Hypertension was observed in 25% of the patients, and dyslipidemia was noted in 45%. We determined that 25% presented with retinopathy, 55% with nephropathy, 35% with neuropathy, and 15% with ischemic cardiopathy. We detected 53 *HNF1A* mutations, including 1 deletion in the promoter region. Of the 52 mutations that occurred in exons, 15 were silent, 29 were missense, 7 were deletions, and 1 was nonsense. Of the 37 mutations not silent, we identified 11 mutations in the A isoform, 2 in the AB isoform, and 24 in the ABC isoform. Regarding protein domain localization, a missense mutation was found in a dimerization domain, 9 mutations were detected in the DNA-binding domain, and 26 mutations were identified in the trans-activation domain. **Conclusion:** *HNF1A* gene mutations might be the cause of diabetes mellitus (DM) in patients with type 1 diabetes diagnoses and clinical features typical of MODY.

Diabetes mellitus (DM) is considered to be one of the great global epidemics of this century, and it affects countries in all stages of development. The increased prevalence of DM is due to several factors, including increased life expectancy, dietary changes, urbanization, industrialization, sedentary lifestyle, and obesity (1).

Among the types of DM, type 1 diabetes stands out and is characterized by the absolute absence of insulin secretion due to the autoimmune destruction of pancreatic tissue. Type 1 diabetes is associated with specific HLA genotypes and is responsible for approximately 10% of DM cases worldwide. In addition to type 1, another DM type is maturity-onset diabetes of the young (MODY), which is characterized by a genetic defect of pancreatic β cells.

MODY is the most common form of monogenic diabetes and is caused by mutations in different genes involved in the function of pancreatic β cells. MODY is responsible for 0.3-2.4% of diabetes cases (2); however, it is often confused with type 1 or type 2 diabetes. Its prevalence is estimated at approximately 5% in type 2 diabetes patients (3) and at 10% among those with type 1 diabetes in many European populations (4). MODY generally affects patients at a young age, but they are not typically dependent on insulin in the early stages. MODY is autosomal dominant with high penetrance; 95% of individuals with a mutation for MODY will develop diabetes or some degree of hyperglycemia before the age of 55 (5).

The most common form of this type of diabetes, called MODY 3, is due to a mutation in the *HNF1A* (hepatocyte nuclear factor 1A) gene and, depending on the population studied, represents up to 65% of all MODY cases. The HNF1A protein is a transcription factor involved in various steps of producing and secreting insulin through its regulation of glucose transporter 2 (GLUT 2) expression (6).

Approximately 10% of the patients classified as type 1 diabetics are wrongly diagnosed, especially those with a family history of DM in 2 or more generations who lack

autoantibodies against pancreatic β -cell components (4) and are negative for high-risk haplotypes associated with type1 diabetes (7). It is important to correctly diagnose these patients because it would change their treatment profile and prognosis and would improve their quality of life.

The clinical features of some type1 diabetic outpatients who were followed up featured a positive family history for DM in 3 generations and low doses of insulin, which suggest a pancreatic insulin reserve. Therefore, we decided to investigate possible mutations in the *HNF1A* gene in these DM patients.

Research design and methods

Patients

The genetic study to investigate *HNF1A* mutations was performed in 20 unrelated patients who were previously diagnosed with type1 diabetes but who had clinical features consistent with MODY according to the American Diabetes Association (ADA). Inclusion criteria were:

- patients with a DM diagnosis before the age of 38;
- positive family history for DM in at least 2 generations;
- low doses of insulin throughout the first 5 years of disease or no use of insulin in that period;
- patients with less than 5 years of disease who were negative for autoantibodies (Anti-GAD);
- levels of C-peptide < 1.2 ng/ml.

Patients were selected from a group of 60 patients who were previously diagnosed with type1 diabetes who were followed as outpatients. Routine DM laboratory tests included fasting glucose, GHb, lipid profile, and C-peptide measurements. Patients were considered nephropathic if they presented with microalbuminuria or proteinuria, which were used to assess diabetic nephropathy. Retina mapping was performed to detect diabetic retinopathy. Patient histories were used to determine coronary disease risk. Previous complaints of

paresthesia, anesthesia, or burning pain in lower limbs (LL) were considered signs of peripheral neuropathy.

Genetic study

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using an EZ-DNA commercial kit (Biological Industries, BeitHaemek, Israel). After extraction, the DNA was amplified by PCR to permit the identification of mutations in exons 1-10 and the promoter of the *HNF1A* gene. The PCR reaction tube had a final volume of 25 μ l and contained 2,5 μ l DNA, 5 U/ μ l 1XGoTaqFlexi DNA Buffer (Promega, Madison, Wisconsin, United States), 10 mM dNTPs, 25 mM MgCl₂, 5 U/ μ l GoTaqFlexi DNA polymerase (Promega), and 20 pmol primer (Invitrogen, Brazil LTDA). The primers used were previously described in the literature (Table 1)(8). Thermocycling was performed on a GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) and consisted of 1 cycle of 95°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 45 sec, 72°C for 1 min, and 1 cycle of 72°C for 7 min. The PCR products were purified using the AccuPrep® Purification Kit (Bionner Corporation). The products were then diluted from an initial concentration of 100 ng/ml to a final concentration of 50 ng/ml using the Big Dye Terminator kit v. 1.1, v. 3.1 (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom, England). The DNA was precipitated with isopropanol/ethanol, and the samples were subsequently resuspended in Hi-Di formamide. Sequencing was performed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). Electropherograms were analyzed using SeqScape v.2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, California, United States), and the consensus sequence of the *HNF1A* gene (HNF 1A; OMIM: 142410) was compared to the results obtained from the sequencing analysis.

Statistical analysis

The results are expressed as means $\pm$ standard deviations for quantitative variables and as percentages for qualitative variables.

The programs used to predict pathogenicity can be accessed through the following links: SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html) and Align-GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/index.php>). These programs predict whether a substitution is well tolerated. The Polyphen program (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) predicts the probability of a damaging effect. The Pmut program (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) predicts whether the mutation is pathogenic.

Results

Clinical profile of patients with suspected MODY

Sixty patients who were previously diagnosed with type1 diabetes were evaluated. Twenty of these patients (11 female, 9 male) were investigated for suspected MODY 3 (33.3%). They had a mean age of 33.6 ± 8.1 years, a mean age at DM diagnosis of 24.3 ± 6.9 years, and had diabetes for an average of 9.25 ± 6.37 years. Twenty-five percent were hypertensive, and 45% were dyslipidemic. Thirty-five percent used metformin as a coadjuvant drug treatment (Table 2). Among the complications exhibited by patients, 25% presented with retinopathy, 55% had nephropathy, 35% presented with symptomatic peripheral neuropathy, and 15% had evidence of ischemic heart disease (Table 3).

Of these 60 patients previously diagnosed with type 1 diabetes, 33.3% had clinical features of MODY. Of these 20 patients, 85% carried some mutation in the *HNF1A* gene. Thus, among the 60 patients, 31.6% could be diagnosed with MODY 3.

HNF1A mutations in type1 diabetes patients with suspected MODY 3

A total of 53 genetic variations were found. Of these, one was a deletion in the promoter, and 52 were exonic mutations. Among the latter, there were 29 missense mutations, 7 deletions, 1 nonsense mutation, and 15 silent mutations. Seventeen had previously been described in the literature as polymorphisms. All missense mutations were

analyzed using bioinformatics tools that combine biophysical and sequence features with protein alignments to predict whether substitutions would be harmful or neutral.

When these mutations were analyzed according to the different isoforms, 34.6% were in isoform A, 9.61% in isoform AB, and 75% in isoform ABC. Analyzing those same mutations according to protein domains revealed that 1 missense mutation was in the dimerization domain, 9 mutations (2 deletions and 7 missense mutations) were in the DNA-binding domain, and 26 mutations (3 deletions, 1 nonsense mutation, and 23 missense mutations) were in the trans-activation domain (Figure 1). It is important to note that one patient carried a frameshift deletion at the A39 position, which would change the entire protein sequence. Table 4 describes the mutations that were characterized as harmful or pathogenic by at least 2 of the 4 programs used.

Discussion

The fact that DM is clinically apparent in patients with mutations in the *HNF1A* gene appears to be due to altered gene expression in pancreatic β -cells that leads to impaired insulin synthesis and secretion, along with abnormal cellular development. These effects occur because *HNF1A* activates transcription of the *HNF4A* gene via the P2 promoter, which in turn activates *HNF1A* transcription. Heterozygous *HNF1A* mutations are the most common cause of MODY worldwide (9). Most of these mutations lead to formation of non-functional heterodimers with the product of the normal allele, thereby preventing DNA binding (10).

It is estimated that *HNF1A* mutations are responsible for 1% of all DM cases in the United Kingdom, with a prevalence of 63% and penetrance of 63% at 25 years and 93.6% at 50 years and 98.7% at 75 years of age (11). In other countries, prevalence ranges from 10 to 21% (12, 13). In Brazil, there are reports prevalence rates between 13 and 46.2% within families of previously diagnosed patients (14-16). Regarding patients with type 1 diabetes,

there are reports that 4.4 to 10% of patients actually have MODY3 (4, 7, 17). This study investigated the frequency of *HNF1A* gene mutations in unrelated patients who were previously diagnosed with type 1 diabetes but presented with clinical features of MODY. Among 60 patients evaluated, 20 had MODY features, and only 1 of these 20 patients did not carry a *HNF1A* mutation. Thus, it is estimated that 33.3% of MODY patients may be mistakenly diagnosed with type 1 diabetes based on clinical and laboratory criteria. Some of the limitations of this study were that the mutations were not functionally analyzed, and there was no family study, which are the only ways to determine if such mutations were the cause of the disease. The difference between the literature and these results may be due to the patient recruitment method and the inclusion criteria. Other studies excluded patients with risk haplotypes for type 1 diabetes (4) and included patients without antibodies against the pancreatic islets (type 1B diabetes) (7). This study included patients with levels of C-peptide >1.2 ng/ml, which indicate a pancreatic reserve of insulin secretion. Antibodies against the pancreatic islets were not evaluated in all patients because the average time with DM was 9.8 years, and the vast majority of patients were already negative for these antibodies. Another important point was that the patients included here either used low doses of insulin (<0.5 IU/kg/day) throughout the first 5 years of the disease or did not use insulin at all. Only later was the dosage increased or combined with another drug, most often biguanide. It is important to note that the daily average dose of insulin of the patients described here was 0.58 ± 0.31 IU/kg.

More than 300 mutations have been described in the *HNF1A* gene sequence and promoter regions (18). The main mutations types are missense mutations, followed by deletions, nonsense mutations, insertions, and duplications (18-20); these negatively affect DNA binding and/or trans-activation (21). This study identified 53 *HNF1A* mutations consisting of 54.71% missense mutations, 15.09% deletions, and 1.88% nonsense mutations.

These findings agree with reports in the literature (18-20). Of the mutations not silent identified, 1.88% were found in the dimerization domain, 16.98% in the DNA-binding domain, and 49.05% in the trans-activation domain.

Of the 37 exon mutations not silent, 11 were located in isoform A, 2 in isoform AB and 24 in isoform ABC. These results agree with those of Bellanné-Chantelot *et al.* (20), who showed that most *HNF1A* mutations are located between exons 1 and 6, thus affecting all 3 isoforms (ABC), followed by isoform A and isoform AB. However, the present results differ from other authors who showed that most mutations affected isoform AB, followed by isoforms ABC and A (22).

The dimerization domain is essential for the binding of DNA to its coactivator, and mutations in that region affect the capacity of HNF to form dimers and interact with the coactivator to form the tetrameric complex (12), thereby destabilizing DNA binding and affecting all functions of the gene and protein (23). Furthermore, a single amino acid substitution in this sequence is not enough to cause a pathogenic mutation because its pathogenicity will depend on the nature of the new amino acid relative to the wild type in terms of polarity, pH, and other features. Therefore, it is necessary to functionally evaluate the mutant protein.

This study identified only one mutation in the dimerization domain (I27L). This mutation has been described as a polymorphism in several studies. Its prevalence has been widely studied in type 2 diabetes in different population groups (23) and ranges between 40 and 50% (24). Isoleucine is an amino acid conserved across various species, indicating a potentially important role in the protein. *In vitro*, this polymorphism has been associated with decreased gene transcription and glucose transporter promoter function (6). Changes in glucose metabolism have been indicated *in vivo*; they are mainly associated with insulin resistance and are more significant in homozygotes. Thus, this polymorphism directly alters

glucose metabolism or acts as a genetic marker for another mutated gene in this region (25). However, in 2003, the same author suggested that this mutation would also be associated with a decline in β cell function in homozygotes. The mutation was also reported by another author (26), who proposed that it would have some role in the pathogenesis of type 2 diabetes in an Asian population. However, several reports have shown that there is no evidence of an association between this polymorphism and type 2 diabetes (27, 28).

It has been demonstrated that this polymorphism, I27L, is protective against hypertriglyceridemia in patients with type 2 diabetes and patients with late-onset autosomal-dominant DM (29). Moreover, there are reports that it increases levels of high-density lipoprotein cholesterol (30).

In this study, 5 patients carried this mutation, including 2 heterozygous and 3 homozygous patients. The former have clinical features of greater insulin resistance than the latter. These results agree with those of Urhammer *et al.* (23) and Chiu *et al.* (25).

The mutational hotspot in the complex with high promoter affinity was crystallized and revealed that mutations in binding domain regions, especially in the POU domain, are very important for protein/DNA interaction and recognition of its nuclear position, in addition to stability, either through its interaction to the DNA or its three-dimensional structure in the POU_S-POU_H interaction (31). Results corroborated by other authors showed that amino acids 158-171 were responsible for protein cellular localization (32). The following 9 mutations were found in the DNA-binding domain: 3 deletions not yet described in the literature (Q157fsdelG, Q170fsdelG, and E172fsdelG); 1 missense mutation that was already described in the literature (A98V); another missense mutation also previously described with different substitutions (M154I); and 4 missense mutations not yet reported (K155R, V167I, V262A, and S249L). Four of these mutations were located in the POU domain. The deletions were found in 2 patients, 1 in AG 03, who had already been shown to carry another deletion at position 39

(A39fsdelC) that was V172fsdelG, which may generate a truncated protein that is completely different from the wild type. The other mutations, Q157fsdelG and Q170fsdelG, were identified in another patient (AG08) and are also suggestive of a generated 173 amino acid protein with extensive changes in the POU domain. Ryffel (19) classified some mutations as leading to one of the following effects: 1) decrease of function; 2) loss of function; 3) and loss and negative domain. Thus, it can be inferred that nearby mutations could have the same effect, such as R171X (loss) and K158N (loss and negative domain), which appear in this study as E172fsdelG and Q157fsdelG, respectively, and would result in the loss of protein function. This phenomenon would occur as a result of the deletion itself.

In India, the A98V polymorphism was more prevalent in MODY when comparing normal individuals and patients with type 2 diabetes (33). This same polymorphism has already been described by other authors who demonstrated its association with an approximately 20% reduction of C-peptide levels and lower insulin secretion in the first 30 minutes after glucose overload in healthy middle-aged individuals (23). It has also been reported that this polymorphism increases the risk of developing type 2 diabetes in its carriers (34). Giuffrida *et al.* (29) demonstrated that this polymorphism was present in 22.2% of patients with late-onset autosomal-dominant DM. Comparing these results to those of this study showed that the patient who carried the mutation required insulin replacement within the first 6 months of illness, although they had initially presented with features of type 2 diabetes. However, it is worth noting that, in addition to this polymorphism, the patient carried 3 more mutations, including 2 that have not yet been reported in the literature (L408P, P409S); the other mutation, S487N, has already been reported and is related to type 2 diabetes. These mutations were determined to be pathogenic when analyzed by PMUT (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>). Therefore, in addition to the disability caused by A98V, the patient exhibited poor control due to the other 3 mutations, possibly due to a combination

of factors (change in secretion, insulin resistance, and perhaps even changes in the incretin system) (35).

The trans-activation domain is extremely important for DNA transcription (36). Changes in that domain affect trans-activation activity and subsequent nuclear transport (37). It has already been demonstrated that mutant proteins containing between 348 and 416 residues accumulate outside the nuclear membrane and are unable to activate their target genes (38). Bjorkhaug *et al.* (32) showed that deletions between amino acids 398 and 470 and between 544 and 631 result in reduced levels of transcription when compared to the wild type protein. This study identified 26 mutations in the trans-activation domain, including 22 missense mutations (see Figure 1), the previously described Q495X nonsense mutation (39), and 3 deletions not yet described in the literature (E390fsdelG, E390fsdelG, and Q391fsdelG). The 2 patients with these deletions may generate proteins that are truncated at amino acids 412 and 417, respectively. Thus, one can assume that they would exhibit worse metabolic control because of reduced levels of transcription and blocked translocation of transcripts to the nucleus to perform their functions.

Mutations in the promoter enhance HNF1A binding to non-identified proteins, and deletions are associated with increased *HNF1A* expression. In 1999, Yoshiuchi *et al.* (17) demonstrated that some missense mutations in that region could lead to increased promoter activity with consequent increased levels of HNF1A and its activity. It has already been demonstrated that *HNF1A* overexpression downregulates the expression of HNF4A-dependent genes, which, in turn, loses HNF1 binding sites in the promoter region (40). In this study, we found 2 patients with the same deletion in the promoter, but they expressed different phenotypes. One patient had clinical features suggesting greater insulin resistance, such as mild obesity; however, this patient carried another mutation, S487D, which has already been described as a polymorphism possibly associated with type 2 diabetes. The other

patient, who was thinner, carried a stop codon at position Q495X in addition to the deletion in the promoter. The early stop codon generates a truncated protein, thus changing protein transcription, and may be responsible for the patient's diabetes and complications, including nephropathy and diabetic neuropathy.

In view of these findings, we concluded that MODY 3 may be an important cause of monogenic diabetes among patients. Therefore, molecular analysis of this gene should be performed in patients with a suspected diagnosis of MODY.

Study limitations

We did not perform functionality testing to confirm the effects of mutations on pancreatic β -cell insulin secretion.

Ethical aspects

The study was approved by the Maranhão Federal University Hospital's Research Ethics Committee and is registered as CEP 186/09 and protocol number 004798/2009-00. Patient interviews and material collection were performed only after the study, its goals, and the patient's rights (including the right to withdraw from the study at any time) had been explained and the informed consent form had been signed by the patient or their guardian, based on Ordinance 196/96 of the National Health Council of the Ministry of Health.

Acknowledgments

We thank to the Maranhão Federal University Hospital (Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão). In this research the authors's contributions are:

AGFPA: Responsible for drafting the questionnaire, applying it to patients, collecting blood samples, performing data analysis, and writing the manuscript.

BAN: Responsible for performing the molecular biology exams.

FOG: Responsible for assisting with the molecular biology exams.

MSF: Research co-supervisor responsible for reviewing the manuscript

ERRBPLM: Research supervisor and responsible for reviewing the manuscript.

Conflict of interest

None of the authors of the above manuscript has any conflict of interest to declare.

References

1. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-1197
2. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia* 2012;55:1265-1272
3. Lederman HM. Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet* 1995;345:648
4. Moller AM, Dalgaard LT, Pociot F, Nerup J, Hansen T, Pedersen O. Mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in Caucasian families originally classified as having type I diabetes. *Diabetologia* 1998;41:1528-1531
5. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT. B-cell genes and diabetes: Molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 2001;50(Suppl 1):S94-S100
6. Holmkvist J, Cervin C, Lysenko V, Winckler W, Anevski D, Cilio C, Almgren P, Berglund G, Nilsson P, Tuomi T, Lindgren CM, Altshuler D, Groop L. Common variants in HNF - 1 α and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49:2882-2891
7. Kawasaki E, Sera Y, Yamakawa K, Abe T, Ozaki M, Uotani S, Ohtsu N, Takino H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Matsuura N, Eguchi K. Identification and functional analysis of mutations in the hepatocyte nuclear factor - 1 α gene in anti-islet autoantibody-negative Japanese patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:331- 335
8. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen

- O, Polonsky KS, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 1996;384:455-458
9. Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie AD, Baird JD, Kaisaki PJ, Yamagata K, Bell GI, Bain SC, Hattersley AT. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1a gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 1997;46:720-725
 10. Bonatto N. Prospecção de mutações gênicas relacionadas ao diabetes mellitus tipo MODY na região dos Campos Gerais, Paraná [Mining for gene mutations related to diabetes mellitus type MODY in the region of Campos Gerais, Paraná]. Thesis, Graduate Program in Genetics, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011, 58 p.
 11. Shepherd M, Sparkes AC, Hattersley AT. Genetic testing in maturity onset diabetes of the young (MODY): a new challenge for the diabetic clinic. *Practical Diabetes International* 2001;18:16-21.
 12. Radha V, Ek J, Anuradha S, Hansen T, Pedersen O, Mohan V. Identification of novel variants in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in south Indian patients with maturity onset diabetes of young. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1959-1965
 13. Lopez PA, Foscaldi AS, Perez MS, Rodrigues M, Traersa M, Puchulu FM, Bergada I, Frechtel GD. HNF 1 alpha gene coding regions mutations screening, in a Caucasian population clinically characterized as MODY from Argentina. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;91:208-212
 14. Furuzawa GK, Giuffrida FM, Oliveira CS, Chacra AR, Dib SA, Reis AF. Low prevalence of MODY2 and MODY 3 mutations in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;81:e12-e14
 15. Maraschin JF, Kannengiesser C, Murussi N, Campagnolo N, Canani LH, Gross JL, Velho G, Grandchamp B, Silveiro SP. HNF-1 mutations are present in half of clinically

- defined MODY patients in South-Brazilian individuals. *Arq Bras EndocrinolMetab* 2008;52:1326-1331
16. Moises RS, Reis AF, Morel V, Chacra AR, Dib SA, Bellanne-Chantelot C, Velho G. Prevalence of maturity-onset diabetes of the young mutations in Brazilian families with autosomal-dominant early-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:786-788
 17. Yoshiuchi I, Yamagata K, Yang Q, Iwahashi H, Okita K, Yamamoto K, Oue T, Imagawa A, Hamaguchi T, Yamasaki T, Horikawa Y, Satoh T, Nakajima H, Miyazaki J, Higashiyama S, Miyagawa J, Namba M, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Three new mutations in the hepatocyte nuclear factor-1a gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: clinical features and functional characterization. *Diabetologia* 1999;42:621-626
 18. Ellard S, Colclough K. 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. *Hum Mutat* 2006;27:854-869
 19. Ryffel GU. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J MolEndocrinol* 2001;27:11-29
 20. Bellanné-Chantelot C, Carette C, Riveline JP, Valéro R, Gautier JF, Larger E, Reznik Y, Ducluzeau PH, Sola A, Hartemann-Heurtier A, Lecomte P, Chaillous L, Laloi-Michelin M, Wilhem JM, Cuny P, Duron F, Guerci B, Jeandidier N, Mosnier-Pudar H, Assayag M, Dubois-Laforgue D, Velho G, Timsit J. The type and the position of NHF 1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity onset diabetes of the young (MODY)-3. *Diabetes* 2008;57:503-508
 21. Thomas H, Badenberg B, Bulman M, Lemm I, Lausen J, Kind L, Roosen S, Ellard S, Hattersley AT, Ryffel GU. Evidence for haploinsufficiency of the human HNF1alpha

- gene revealed by functional characterization of MODY3-associated mutations. *BiolChem* 2002;383:1691-1700
22. Harries LW, Ellard S, Stride A, Morgan NG, Hattersley AT. Isomers of the TCF-1 gene encoding hepatocyte nuclear factor -1 show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Hum MolGenet* 2006;15:2216-2224
 23. Urhammer SA, Fridberg M, Hansen T, Rasmussen SK, Moller AM, Clausen JO, Pederson O. A prevalence amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene is associated with reduced serum C-peptide and insulin responses to an oral glucose challenge. *Diabetes* 1997;46:912-916
 24. Chiu KC, Chuang LM, Chu A, Yoon C, Wang M. Comparison of the impact of the I27L L polymorphism of the hepatocyte nuclear factor-1 α on estimated and measured beta cell indices. *Eur J Endocrinol* 2003;148:641-647
 25. Chiu KC, Chuang LM, Ryu JM, Tsai GP, Saad MF. The I27L amino acid polymorphism of hepatic nuclearfactor-1 α is associated with insulin resistance. *J ClinEndocrinolMetab* 2000;85:2178-2183
 26. Chen T, Cao X, Long Y, Zhang X, Yu H, Xu J, Yu T, Tian H. 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). *Int J Diabetes Mellit* 2010;2:28-31
 27. Yamada S, Nishigori H, Onda H, Utsugi T, Yanagawa T, Maruyama T, Onigata K, Nagashima K, Nagai R, Morikawa A, Takeuchi T, Takeda J. Identification of mutations in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 α gene in Japanese subjects with IDDM. *Diabetes* 1997;46: 1643-1647

28. Nishigori H, Yamada S, Kohama T, Tomura H, Sho K, Horikawa Y, Bell GI, Takeuchi T, Takeda J. Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1 β associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes* 1998;47:1354-1355
29. Giuffrida FM, Furuzawa GK, Kasamatsu TS, Oliveira MM, Reis AF, Dib SA. HNF1A gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in individuals with late-onset autosomal dominant diabetes: a cross-sectional study. *CardiovascDiabetol* 2009;8:28
30. Babaya N, Ikegami H, Fujisawa T, Nojima K, Itoi-Babaya M, Inoue K, Nakura J, Abe M, Yamamoto M, Jin JJ, Wu Z, Miki T, Fukuda M, Ogihara T. Association of I27L polymorphism of hepatocyte nuclear factor-1 gene with high-density lipoprotein cholesterol level. *J ClinEndocrinolMetab* 2003;88:2548-2551
31. Chi YI, Frantz JD, Oh BC, Hansen L, Dhe-Paganon S, Shoelson SE. Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1 α . *MolCell* 2002;10:1129-1137
32. Bjorkhaug L, Ye H, Horikawa Y, Sovik O, Molven A, Njolstad PR. MODY associated with two novel hepatocyte nuclear factor-1-alpha loss-of-function mutations (P112L and Q466X). *BiochemBiophys Res Commun* 2000;279:792-798
33. Anuradha S, Radha V, Deepa R, Hansen T, Bendix C, Pedersen O, Mohan V. A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 (Ala98Val) of the hepatocyte nuclear factor -1 α is associated with maturity-onset diabetes of the young and younger age at onset of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 2005;28:2430-2435
34. Winckler W, Burt NP, Holmkvist J, Cervin C, de Bakker PI, Sun M, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Ardlie KG, Daly MJ, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop L. Association of common variation in the HNF1alpha gene region with risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54:2336-2342

35. Kyithar MP, Bacon S, Pannu KK, Rizvi SR, Colclough K, Ellard S, Byrne MM. Identification of HNF1A-MODY and HNF4A-MODY in Irish families: phenotypic characteristics and therapeutic implications. *Diabetes Metab* 2011;37:512-519
36. Bach I, Yaniv M. More potent transcriptional activator or transdominant inhibitors of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J* 1993;12:4229-4242
37. Yang Q, Yamagata K, Yamamoto K, Miyagawa J, Takeda J, Iwasaki N, Iwahashi H, Yoshiuchi I, Namba M, Miyazaki J, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Structure/function studies of hepatocyte nuclear factor-1 α , a diabetes-associated transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:196-202
38. Sourdive DJ, Chouard T, Yaniv M. The HNF 1 C-terminal domain contributes to transcriptional activity and modulates nuclear localization. *CR AcadSci III* 1993;316:385-394
39. Awa WL, Thon A, Raile K, Grulich-Henn J, Meissner T, Schober E, Holl RW, DPV-WISS Study Group. Genetic and clinical characteristics of patients with HNF 1A gene variations from the German-Austrian DPV database. *Eur J Endocrinol* 2011;164:513-520
40. Ktistaki E, Talianidis I. Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 1997;277:109-112

Table 1. *HNF1A* primer sequences

PRIMER	SEQUENCE	BP
Promot1-F	ACTGTTCTTGGCACATGGTAATC	415
Promot1-R	CCCTGCAAAGTGCAGGCCTCA	415
Promot2-F	TCCCATCGCAGGCCATAGCTC	388
Promot2-R	GCTCCGTCTGCAGCTGGCTCA	388
EX1-F	TGGCAGCCGAGCCATGGTTTC	415
EX1-R	GAAGGGGGGCTCGTTAGGAGC	415
EX2-F	CAGCCCTTGCTGAGCAGATCC	366
EX2-R	CCACTGACTTCCTTTCCATCTACC	366
EX3-F	GGGCAAGGTCAGGGGAATGGA	304
EX3-R	CAGCCCAGACCAAACCAGCAC	304
EX4-F	CAGAACCCTCCCCTTCATGCC	360
EX4-R	CCCACCTTCCCACGTGTCCC	360
EX5-F	AACCAATGGAGTTTGAAGTGCTGA	321
EX5-R	GCCTCCCTAGGGACTGCTCCA	321
EX6-F	TGGAGCAGTCCCTAGGGAGGC	322
EX6-R	GTTGCCCCATGAGCCTCCAC	322
EX7-F	GGTCTTGGGCAGGGGTGGGAT	321
EX7-R	CTGCAATGCCTGCCAGGCACC	321
EX8-F	GAGGCCTGGGACTAGGGCTGC	229
EX8-R	CTCTGTGACAGGCCAAGGGAG	229
EX9-F	CCTGTGACAGAGCCCCTCACC	318
EX9-R	TAGGCCTGCTGCATGCACAGC	318
EX10-F	GTACCCCTAGGGACAGGCAGG	248
EX10-R	ACCCCCAAGCAGGCAGTACA	248

Table 2. Characteristics of patients with clinical suspicion of MODY. São Luis, Maranhão, 2011.

N = 20	
Sex (F/M)	11/9
Current age (years)	33.6 ± 8.1
Age at diagnosis (years)	24.3 ± 6.9
Time with illness (years)	9.2 ± 6.3
BMI (kg/m ²)	24.7 ± 4.7
AC(F/M) (cm)	87.4 ± 11.9/88.1 ± 9.3
Fasting glucose (mg/dl)	116.9 ± 38.47
Glycated hemoglobin (%)	6.9 ± 1.4
Total insulin dose (IU/kg of weight)	0.58 ± 0.3
Metformin	7/20 (35%)
SBP (mmHg)	117 ± 15
DBP (mmHg)	78.4 ± 11.4
SAH	25%
Dyslipidemia	45%

AC=Abdominal circumference; SAH=systemic arterial hypertension.

Table 3.Complications in patients with suspected MODY. São Luis, Maranhão, 2011.

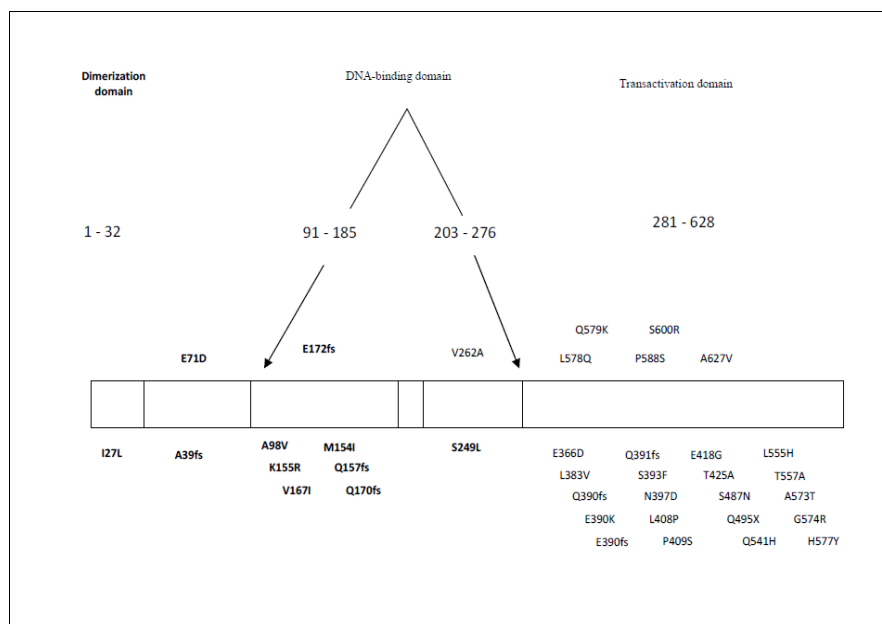
Complications	Frequency
Retinopathy	5/20 (25%)
Nephropathy	11/20 (55%)
Neuropathy	7/20 (35%)
Ischemic heart disease	3/20 (15%)

Table 4. Missense mutations identified and characterized as harmful or pathogenic.

Mutation	
A98V	c.293C>T
S249L	c.747>T
V262A	c.786T>C
L383V	c.1147C>G
S393F	c.1178C>T
L408P	c.1223T>C
E418G	c.1253A>G
T425A	c.1273A>G
S487N	c.1406G>A
Q541H	c.1625G>T
L555H	c.1665T>A
A573T	c.1719G>A
H577Y	c.1731C>T
L578Q	c.1735T>A
Q579K	c.1735C>A
P588S	c.1764C>T
S600R	c.1801C>A
A627V	c.1880C>T

Figure legend

Figure 1. Schematic of HNF1A protein structure by functional domain, with known mutations shown.



7. SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO

7.1. DIABETIC MEDICINE A2

7.2. NORMAS EDITORIAIS

Manuscript Submission

All manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/dme>. A user ID and password for the site can be obtained on first use. Online submission ensures the quickest possible review and allows authors to track the progress of their papers online. It is recommended that text files are uploaded as Microsoft Word documents (all versions), generic rich text format (RTF) files and figures as JPEG, GIF, TIFF or EPS files. Please include a word count for a) the abstract and b) the article. Help is available online or by e-mailing support@scholarone.com.

**Update (25 May 2012): Please note that we now accept .doc and .docx files.*

Paperwork required upon submission

Papers accepted must be licensed for publication in the Journal, and an Exclusive Licence Form (available at www.blackwellpublishing.com/pdf/DME_ELF.pdf) as well as a Declaration of Competing Interests form (available at www.blackwellpublishing.com/pdf/DME_DCI.pdf) must accompany every submitted paper (for the Open Access service please refer to the OnlineOpen section below). Authors will be required to license copyright for their paper to Wiley Blackwell.

Please complete the two forms and send them to the Editorial Assistant as scanned attachments in JPEG or TIFF format (saved with your DME reference number in the file name) via e-mail to dme_editorial@wiley.com. If you are unable to send the forms electronically, please notify the Editorial Office and post any hard copies to:

Diabetic Medicine Editorial Office
Wiley-Blackwell
The Atrium
Southern Gate

Chichester PO19 8SQ
United Kingdom

In addition, please include a Declaration of Competing Interests within the text, placing it just before the References.

If you have answered no to all of the questions, then simply state in the manuscript:

"Declaration of Competing Interests: Nothing to declare"

Please note that papers will NOT be sent for review and will be returned to authors if the completed ELF and DCI forms are not sent to the Editorial Assistant on submission.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Presentation

Authors should familiarize themselves with the style and content of articles in Diabetic Medicine before preparing a manuscript. Authors are encouraged to read Wiley-Blackwell's House Style Guide, available at <http://www.blackwellpublishing.com/housestyle> prior to submitting a manuscript. The Editor retains the right to refuse a manuscript at any stage of the publication process, and to publish a paper under whatever group heading is considered appropriate. The Editor's decision is final.

Reviewers

Authors are asked to facilitate the review process by providing the names and email addresses of at least three suitable reviewers, on the understanding that the Editor is not bound by any such nomination.

Types of Article

IMPORTANT NEW POLICY:

From 1st May 2012, the Journal will publish Case Reports online-only with the abstract published in the accompanying print version of the Journal. The article is fully citable using its Digital Object Identifier (DOI) number.

Submissions of Case Reports after the new policy has taken effect would be considered to mean the authors have read and accepted the publication terms.

The following types of article will be considered for publication:

Original Articles

Original research studies of relevance to diabetes mellitus science and practice. Clinical science and clinically relevant basic science papers will be considered. Maximum length 3000 words, with 30 references.

Clinical Practice

Original articles focusing on issues directly related to the clinical presentations and management of diabetes mellitus.

Epidemiology

Papers considered for this section are most likely to be successful if they are the first contemporary report of the prevalence of, for example, glucose intolerance (or the first report using good methodology) in a particular population group, preferably in which there is international interest, and/or if through the description of the distribution of, for example, diabetes or glucose intolerance by particular population characteristics or by identifying an association with putative risk markers, the data suggest new aetiological or pathogenic hypotheses.

Short Reports Brief (1500 words, with one Figure and one Table and up to 30 references) reports of original or important observations. Rapid publication can be offered in this category.

Case Reports

Descriptions of unusual clinical cases carrying a new or important message. Therefore, cases that present a diagnostic, ethical or management challenge, or that highlight aspects of mechanisms of injury, pharmacology or histopathology are deemed of particular educational value. We want to publish cases worthy of discussion particularly around aspects of differential diagnosis, decision making, management, clinical guidelines and pathology.

Case Reports should not exceed 1500 words with a maximum of 3 tables and/or 3 figures that can include podcasts or video casts if significantly enhance the paper. Up to 20 references are permitted. An Abstract of 250 words or fewer must be provided, structured into Background.

Reviews

Often invited, but unsolicited reviews are welcomed. All will undergo peer review. Reviews should aim to be comprehensive and should include the search methodology used to find the source data. Maximum length 5000 words and 50

references.

Special Reports

Often, but not exclusively, publication of Diabetes UK reports of importance to the diabetes research and clinical practice community.

Technical Reports

Short reports of newly available products with independent observation of their usefulness.

Letters

Comments on previously published papers, items of topical interest, and brief original communications are encouraged for consideration under this heading. The length, including references, should not exceed 800 words plus one figure or table. The letter should not normally be divided into sections. Please give the name and addresses of authors at the end of the letter.

Media review *Book reviews* etc.

Layout

Original articles should conform to the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals - the Vancouver style (Br Med J 1988; 296: 401-405) - as adopted by Diabetic Medicine. The layout should be divided conventionally into subsections, each starting on a new page.

Title page should include the title and manuscript category; authors (initials and surnames but without qualifications); authors' affiliations; name and full address of the author who will check proofs and deal with correspondence (with telephone, fax numbers and E-mail); a running title not exceeding 75 characters including spaces. It should be noted that the electronic submission program, ScholarOne Manuscripts, allows only one author to be designated as the corresponding author

Second page

A structured summary (no more than 250 words and without abbreviations) should describe the content of the paper accurately and the important conclusions, couched in terms which will be understood by the majority of readers of the Journal. The main headings should be aims, methods, results, conclusions. A list of key words (no more than 5) should be given for reference purposes together with a list of abbreviations used.

Third page should begin with the **Introduction** followed by a full description of the methods (generally entitled **Patients and Methods**) then the **Results** and a **Discussion**. The correct hierarchy of headings and subheadings should be indicated.

Footnotes should not be used except in tables.

A **Declaration of Competing Interests** statement must be included in the manuscript, placed just above the reference section (please refer to the "Paperwork" section above for more details). Although the Editors will not reject a paper simply because of a competing interest, they will publish a statement of declared interests.

References are only acceptable if already published or if formal acceptance has been given for publication when the journal title is followed by ('in press'); they are indicated in the text by bracketed numbers and listed in order of quotation in the text, and given in the Vancouver style.

Figures and Illustrations

Illustrations should be separate from the text, and numbered with Arabic numerals. Either screen or high quality electronic images can be included in online submissions, higher quality files can be supplied at acceptance.

Please send us digital versions of your figures. Ideally these should be sent as EPS (line art) or TIFF (photograph/bitmap), or as line art embedded in a word processor document. Avoid using tints less than 20% apart; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse. Always enclose a hard

copy of digitally supplied figures. Further details can be found at <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>.

Figures will be reduced to single column width (80 mm), two-thirds page width (110 mm) or full page width (169 mm) and should be planned accordingly.

Figure legends must be comprehensive in isolation from the text: they should include keys to symbols and indicate the statistical significance of differences.

Tables

These should be created where possible using the table creation facility of your word processing software or typed double spaced on a separate sheet and identified by Arabic numerals corresponding to the order in which they appear in the manuscript. A brief title should head the table. Explanatory matters should be in a footnote.

Supporting Information

We allow submission of "Supporting Information" for online publication only. Go to <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/suppmat.asp> to access the Wiley-Blackwell guidelines for the submission of Supporting Information. If you wish to submit Supporting Information, please select the file designation "Supporting Document for Publication" when uploading your files.

Previous Publication

Papers are accepted on the understanding that no substantial part has been, or will be, published elsewhere. Data that have been published as an abstract of no more than 300 words in a scientific meeting are acceptable. The abstract reference should be quoted under the summary. Papers may be subject to editorial revision without notice and remain the copyright of Diabetes UK. If a paper returned to authors for revision is not received back in the editorial office by a deadline which will be imposed by the Editor, it will be treated as a new submission. The Editors reserve the right to make the final decision whether or not a paper is accepted.

Statement of Consent

Authors must indicate in the text the way in which they have complied with the recommendations of the Declaration of Helsinki (British Medical Journal, 1964, ii, 177). Experimental human studies should first have been approved by a local Ethical Committee, and a statement to this effect should be included. If a patient may be identified from material accepted for publication in Diabetic Medicine (including case reports and illustrations), we require the written consent of the patient to allow publication. Black bands across the eyes are not effective in masking the identity of the patient, and changing details of the patient in an attempt to disguise them is bad scientific practice. A suggested consent form is available at http://www.blackwellpublishing.com/pdf/dme_consent.pdf or from the Editorial office.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Offprints

Authors will be provided with electronic offprints of their article. Paper offprints may be ordered at the prices quoted on the order form, which accompanies the proofs, provided that the form is returned to the address indicated on the form. Offprints are normally despatched within 2 weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the publishers if offprints do not arrive: however, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to 6 weeks to arrive.

Style Guide

Diabetic Medicine does not recognise the term 'diabetic' as a noun. Preferred style is 'patient with diabetes' or 'in the group without diabetes', rather than 'diabetic patient' and 'non-diabetic group'. The terms 'Type 1' and 'Type 2 diabetes mellitus' (abbreviated to Type 1 and Type 2 DM) are preferable to IDDM and NIDDM. 'Men' and 'women' should be used in preference to 'males' and 'females'.

Abbreviations and Units

Except for units of measurement, abbreviations are strongly discouraged. Avoid abbreviations in the title of the manuscript and in the Abstract.

HbA1c Measurement

Diabetic Medicine has adopted dual reporting of glycated haemoglobin (HbA1c) measurement. HbA1c measurements must be reported in IFCC units (mmol/mol - no decimal point) in addition to derived NGSP units (% - one decimal). IFCC units should be listed first followed by NGSP units in parentheses. A HbA1c conversion table is available [here](#). NGSP SD's can be converted directly to IFCC SD's. To do so the slope of the Master Equation to convert NGSP results to IFCC units must be used. For example: 0.3% SD NGSP = $0.3 \times 10.93 = 3.3$ mmol/mol SD IFCC (then round to the nearest integer)

Visual Impairment

If you have difficulty reading *Diabetic Medicine* owing to the size of the text, it is possible to download the journal in a larger format from the internet. The electronic version of *Diabetic Medicine* is available online. Please see

<http://www.blackwellpublishing.com/dme>.

Accepted Articles

Diabetic Medicine offers Accepted Articles, a Wiley Online Library service whereby peer reviewed, accepted articles are rapidly published online, assigned a DOI and indexed in PubMed, prior to typesetting and proofing. This is followed by typesetting and author proofing, and ultimately by inclusion in an issue, with the final version replacing the Accepted Articles version. The nature of Accepted Articles mean that they do not yet have volume, issue or page numbers, so these articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continued to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at <http://www.doi.org/faq.html>.

Author Services

NEW: Online production tracking is now available for articles through Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they do not need to contact the Production Editor to check on progress. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Disclaimer

The Publisher and Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal, the views and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher and the Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher and Editors of the products advertised.

7.3. ARTIGO PROPRIAMENTE DITO

Complicações Crônicas em pacientes com MODY

Ana Gregória Ferreira Pereira de Almeida¹, Bruno de Almeida Nunes²,
Fernanda Oliveira Graça³, Manuel dos Santos Faria⁴, Emygdia Rosa do Rêgo Barros
Pires Leal Mesquita⁵

1. Médica endocrinologista, mestranda do Programa Materno – Infantil da Universidade Federal do Maranhão. Responsável pela realização do questionário, assim como sua aplicação junto aos pacientes e coleta de sangue para realização dos exames. Análise dos dados e redação do manuscrito.
2. Biólogo, mestre em Saúde Materno – Infantil da Universidade Federal do Maranhão. Responsável pela realização dos exames da biologia molecular.
3. Aluna do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão. Responsável pelo auxílio na realização dos exames da biologia molecular
4. Doutor em Endocrinologia, Chefe do Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, coorientador da pesquisa, responsável pela revisão do manuscrito.
5. Doutora em Genética Chefe do Serviço do Laboratório de Estudos Genômicos da Universidade Federal do Maranhão, orientadora da pesquisa e responsável pela revisão do manuscrito.

Autora correspondente:

Ana Gregória Ferreira Pereira de Almeida

Rua 21 Quadra 24 n – 01 Cohab Anil IV

São Luis – Maranhão

Brasil

CEP: 65053-430

Fone: +55 98 32695586/ + 55 98 9112 3519

e-mail: agfpalmeida@hotmail.com

Abstract

Diabetes da maturidade com início na idade jovem (MODY) é caracterizado por um defeito na secreção de insulina causado por mutações no gene *HNF1A*. Clinicamente costuma ser confundido com Diabetes Mellitus tipo 1 (DM 1) devido a idade de início de doença que geralmente antes dos 25 anos. Como estes dois tipos de diabetes ocorrem em pacientes de mesma idade, este estudo se propõe a investigar o surgimento das complicações crônicas próprias do DM em pacientes com MODY, comparando-as aos pacientes com DM 1. Foram avaliados um total de 58 pacientes, 38 com diagnóstico de DM 1 e 20 com diagnóstico clínico de MODY. Entre os pacientes com DM1 65,79% eram do sexo feminino. Tinham a idade de início do DM de $17,21 \pm 9,38$ anos com tempo de doença de $8,74 \pm 6,23$. Já os pacientes com MODY, 55% eram do sexo feminino, a idade de início de doença foi de $24,35 \pm 6,91$ anos com tempo de doença de $9,2 \pm 6,3$ anos. Já em relação às características clínicas o IMC dos pacientes com DM 1 e MODY forma, respectivamente, $22,52 \pm 3,70$ e $24,76 \pm 4,77$. Em relação ao controle metabólico, observou-se que pacientes com MODY apresentaram uma Hb glicada de $6,9 \pm 1,4\%$ usando uma dose total de insulina de $0,58 \pm 0,31$ UI/kg/dia. Já os pacientes com DM 1 apresentaram a média de hemoglobina glica de $8,34 \pm 3,6\%$ com uma dose total de insulina de $0,99 \pm 0,52$ UI/kg/dia. Dentre outras patologias investigadas que podem contribuir para surgimento de complicações crônicas observou-se a HAS, que se revelou com 21,05% entre os pacientes com DM 1 e 25% entre aqueles com MODY. Já a dislipidemia estava presente em 36,84% dos pacientes com DM 1 e 45% dos pacientes com MODY. Quanto as complicações crônicas, observou-se que a retinopatia estava presente em 34,21% dos pacientes com DM 1 e 25% daqueles com MODY, a nefropatia em 34,21% e 55% dos pacientes com DM 1 e MODY respectivamente. Já quanto a neuropatia, observou-se 26,32% em DM 1 e 35% em MODY e a coronariopatia foi observada em 5,26% DM e 15% nos pacientes com MODY. Diante destes resultados conclui-se não haver diferença entre o surgimento de complicações crônicas entre os pacientes com MODY e DM1.

1. Introdução

O Diabetes mellitus (DM) é uma patologia que vem apresentando características de epidemia e junto dela vêm às complicações crônicas micro e macrovasculares decorrentes de um mau controle metabólico. Dentro de sua classificação tem-se de forma geral o Diabetes tipo 1 (DM 1), Diabetes tipo 2 (DM 2) e outros tipos¹. Destes outros tipos, nota-se MODY (*Maturity Onset Diabetes of Young*), que é o DM monogênico autossômico dominante com características de DM 2 que acomete pessoas geralmente antes dos 25 anos de idade².

Dentro deste tipo, o mais prevalente em todo o mundo é o MODY^{3,4}, caracterizado por um defeito na secreção de insulina causado por mutações no gene *HNF1A*⁵. Apresenta-se clinicamente, na fase inicial, como uma hiperglicemia leve responsiva a sulfoniureia e que posteriormente pode evoluir para necessidades de insulina⁶.

Neste tipo de DM, trabalhos têm demonstrado que dependendo da mutação, estes pacientes podem apresentar mais ou menos complicações crônicas quando comparados ao DM 1 e DM 2⁷, mas outros têm revelado que estas complicações podem surgir independente dos tipos de mutação presentes nos pacientes e sim tendo relação com o tempo de exposição a hiperglicemia, que seria o principal fator para o surgimento das complicações, assim como o descontrole metabólico^{8,9}.

Como estes pacientes têm um tempo de surgimento de DM comparado ao DM 1 poder-se-ia inferir que eles apresentariam uma mesma taxa de complicações que os pacientes com DM1. Frente a esta afirmativa, este trabalho se propõe investigar as complicações crônicas típicas do DM em pacientes com características clínicas de MODY comparando-as aso pacientes com DM 1.

METODOLOGIA

Foi avaliado um total de 58 pacientes acompanhados em ambulatório de DM, todos em uso de insulina e preenchendo critérios clínicos e laboratoriais para diagnóstico de DM conforme OMS e ADA. Destes 20 tinham características clínicas de MODY, sendo que 19 apresentaram mutações no gene *HNF 1A* e 38 com diagnóstico clínico de DM 1. Para sua avaliação foi realizado um interrogatório de

história e exame clínico próprio com características epidemiológicas e de avaliação laboratorial.

Para a determinação das complicações foram empregados os seguintes critérios:

7. Nefropatia diabética: foram considerados nefropatas aqueles pacientes que apresentavam valores de microalbuminúria de 24h > 30 mg/24h ou proteinúria > 140 mg/24h.

8. Retinopatia diabética: avaliado pelo mapeamento da retina e classificado como possuindo ou não a retinopatia.

9. Neuropatia diabética: avaliado pela investigação clínica de sintomas típicos como parestesia, anestesia, dor em queimação de membros inferiores, hipoglicemia sem sinais e sintomas típicos, episódios de diarreia alternados com constipação. sendo descartado qualquer outra patologia. Caso apresentasse algum sintoma era caracterizado como portador da neuropatia.

10. Vasculopatia diabética:

a. Coronariopatia: sinais ou sintomas típicos ou avaliação cardiológica mostrando tais alterações ou história prévia de coronariopatia.

b. Periférica: sinais e sintomas típicos de insuficiência vascular periférica.

Os resultados foram analisados em programa de estatística próprio, sendo descritos as variáveis numéricas como média e desvio padrão, as quantitativas em percentagem e correlação das complicações crônicas entre DM 1 e MODY utilizou-se Qui-quadrado com correção de Yates considerada significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

Foram avaliados um total de 58 pacientes, 38 com diagnóstico de DM 1 e 20 com diagnóstico clínico de MODY. Entre os pacientes com DM1 65,79% eram do sexo feminino. Tinham a idade de início do DM em torno de $17,21 \pm 9,38$ anos com tempo de doença de $8,74 \pm 6,23$. Já os pacientes com MODY, 55% eram do sexo feminino, a idade de início de doença foi significativamente maior que em pacientes com DM1, em torno de $24,35 \pm 6,91$ anos com tempo de doença de $9,2 \pm 6,3$ anos. Já em relação às características clínicas o IMC dos pacientes com DM 1 e MODY forma, respectivamente, $22,52 \pm 3,70$ e $24,76 \pm 4,77$. Em relação ao controle metabólico, observou-se que pacientes com MODY apresentaram uma Hb glicada de $6,9 \pm 1,4\%$ usando uma dose total de insulina de $0,58 \pm 0,31$ UI/kg/dia. Já os

pacientes com DM 1 apresentaram a média de hemoglobina glica de $8,34 \pm 3,6\%$ com uma dose total de insulina de $0,99 \pm 0,52$ UI/kg/dia, sendo singnificantemente maior que a dose dos pacientes com MODY. Dentre outras patologias investigadas que podem contribuir para surgimento de complicações crônicas observou-se a HAS, que se revelou com 21,05% entre os pacientes com DM 1 e 25% entre aqueles com MODY. Já a dislipidemia estava presente em 36,84% dos pacientes com DM 1 e 45% dos pacientes com MODY. Quanto as complicações crônicas, observou-se que a retinopatia estava presente em 34,21% dos pacientes com DM 1 e 25% daqueles com MODY, a nefropatia em 34,21% e 55% dos pacientes com DM 1 e MODY respectivamente. Já quanto a neuropatia, observou-se 26,32% em DM 1 e 35% em MODY e a coronariopatia foi observada em 5,26% DM e 15% nos pacientes com MODY (Tabela 1). Importante ressaltar que entre estes pacientes nenhum tinha história de tabagismo.

Discussão

Pesquisas revelam que complicações crônicas próprias do DM apresentam a mesma prevalência tanto em DM 1 quanto em MODY(10,11). No presente estudo observou-se que a prevalência destas complicações foi: 25% para retinopatia, 55% para nefropatia, 35% para neuropatia periférica sintomática e 15% para miocardiopatia isquêmica. Não havendo diferença entre os pacientes com DM1. Estes resultados concordam com os resultados encontrados por Barrio e col. (2002) que mostraram uma prevalência de complicações crônicas em famílias com MODY de 41% para nefropatia e retinopatia. No entanto, outros pesquisadores observaram uma taxa de complicações de 25% para retinopatia, 3,2% para nefropatia (microalbuminúria), 3,2% para polineuropatia e 10% com doença vascular periférica¹². Esta última complicação não foi encontrada nos pacientes da presente pesquisa.

Ao se analisar as causas para o surgimento das complicações, pesquisadores relatam que estas são intimamente relacionadas ao tempo de doença e controle glicêmico¹⁰⁻¹¹. Em relação ao tempo de doença, este estudo foi concordante com a literatura, pois não houve diferença entre esta variável entre os grupos. No entanto, ao se correlacionar as complicações crônicas ao controle metabólico, não se observou essa relação causa e efeito. Já que os pacientes com MODY

apresentaram uma Hb glicada menor que aqueles com DM 1, isso sendo conseguido com uma dose menor de insulina.

Isto sugere que outros fatores teriam importância no surgimento das complicações crônicas em pacientes com MODY. Estudos relatam que o surgimento e evolução dessas complicações estariam relacionadas aos tipos e localização das mutações dentro do gene e sua influência nas proteínas^{12,13}, assim como a existência de uma história familiar de DM 2 em progenitor não portador de mutação no gene *HNF 1A*, no caso para MODY 3^{8,9}.

Para as complicações macrovasculares, em especial, a coronariopatia, nosso trabalho mostrou uma prevalência de 15%, a mesma relatada em outros trabalhos¹⁰. Contudo, estes evidenciaram que esta complicação foi mais freqüente em pacientes com MODY que aqueles com DM 1, independente da hipertensão, mas não chegando aos níveis dos pacientes com DM2.

Estudo realizado por Richter e col.¹⁴, em 2003 mostraram que humanos com mutações heterozigóticas no gene *HNF 1A* têm diminuída expressão de ApoM, maior componente da lipoproteína de densidade muito alta (HDL), sugerindo que isto possa causar aumento da aterogênese e em consequência aumento do risco cardiovascular. Outros pesquisadores evidenciaram que pacientes com mutações no *HNF 1A* apresentaram uma taxa de mortalidade por doença cardiovascular de 66% quando comparado ao controle (43%) (pessoas sem DM), com esta sendo também precoce¹⁵. Estes autores chegaram a recomendar o uso de estatina em todo paciente com DM por mutação no *HNF 1A* acima de 40 anos.

Frente a estes resultados, conclui-se que pacientes com MODY apresentam a mesma prevalência de complicações crônicas que os pacientes com DM 1, e estas são independentes de seu controle glicêmico, sugerindo que outros fatores estejam associados ao seu surgimento.

Referência Bibliográfica

1. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complication. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; 1999.
2. Vaxillaire M., Froguel P. Monogenic Diabetes in the Young, Pharmacogenetics and Relevance to Multifactorial Forms of Type 2 Diabetes. *Endocrine Review*. 2008; 29(3): 254-264.
3. Fajans, S. S.; Bell, G. I.; Polonsky, K. S.. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*. 2001; 345(13): 971 – 980.
4. Barrio, R.; Bellanné-Chantelot, C.; Moreno, J.C.; Morel, V.; Calle, H.; Alonso, M.; Mustieles, C. Nine Novel Mutations in Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) Candidate Genes in 22 Spanish Families. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002; 87(6): 2532-2539.
5. Nogaroto V, Svidnicki P V, Bonatto N, Milléo F Q, Almeida M C, Vicari M R, Artoni R F . New HNF - 1 α nonsense mutation causes maturity - onset diabetes of the young type 3. *Clinics* . 2011; 66(1): 167–168.
6. Shepherd M, Shields B, Ellard S, Rubio-Cabezas O, Hattersley AT. A genetic diagnosis of HNF1A diabetes alters treatment and improves glycaemic control in the majority of insulin-treated patients. *Diabet Med*. 2009; 26(4): 437–441.
7. Bellanné-Chantelot, C., Carette, C., Riveline, J. P., Valéro, R., Gautier, J. F., Larger, E., Rezznik, Y., Ducluzeau, P. H., Sola, A., HArtemann-Heurtier, A., Lecomte, P., Chaillous, L., Laloi-Michelin, M., Wilhem, J. M., Cuny, P., Duron, F., Guerci, B., Jeandidier, N., Mosnier-Pudar, H., Assayag, M., Dubois-Laforgue, D., Velho, G., Timsit, J. The type and the position of NHF 1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity onset diabetes of the young (MODY) – 3. *Diabetes*. 2008; 57(2): 503 – 508.
8. Letho, M.; Wipemo, C.; Ivarsson, S. A.; Lindgren, C.; Lipsanen-Nyman, M.; Weng, J. et al. High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia*. 1999; 42(9): 1131 – 1137, August, 1999.
9. Allen, H. L., Johansson, S. Ellard, S., Shields, B., Hertel, J. K., Reader H., Colclough, K., Molven, A., Frayling, T. M., Njolstad, P. R., Hattersley, A. T., Weedon, M. N. Polygenic risk variants for type 2 diabetes susceptibility modify age at diagnosis in monogenic HNF 1A diabetes. *Diabetes*. 2010; 59(1): 266 – 71.
10. Isomaa, B., Henricsson, M., Letho, M., Forsblom, C., Karanko, S., Sarelin, L., Häggblom, M., Groop, L. Chronic diabetic complications in patients with MODY 3 diabetes. *Diabetologia, Alemanha*, v- 41, n – 4, p. 467 – 473, March, 1998.
11. Lee, BC, Appleton, M., Shore, AC., Tooke, JE. Hattersley, AT. Impaired maximum microvascular hyperaemia in patients with MODY 3. *Diabet. Med*. 1999, 16:731-735.
12. Sourdive D.J., Chouard, T., Yaniv, M. The HNF 1 C-terminal domain contributes to transcriptional activity and modulates nuclear localization. *CR Acad. Sci. III*, 1993; 316(4): 385–394.
13. Bjorkhaug, L, Ye, H, Horikawa, Y, Sovik, O, Molven, A, Njolstad, PR. Mody associated with two novel hepatocyte nuclear factor-1-alpha loss-of-function mutations (P112L and Q466X). *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2000; 279: 792 – 798.
14. Kyithar, MP, Bacon, S, Pannu, KK, Rizvi, SR, Colclough, K, Ellard, S, Byrne, MM. Identification of HNF1A-MODY and HNF4A-MODY in Irish families: Phenotypic characteristics and therapeutic implications. *Diabetes & Metabolism*, 2011; 37: 512–519.
15. Richter S, Shih DQ, Pearson ER, Wolfrum C, Fajans SS, Hattersley AT, Stoffel M. Regulation of apolipoprotein M gene expression by MODY3 gene hepatocyte nuclear factor-1alpha: haploinsufficiency is associated with reduced serum apolipoprotein M levels. *Diabetes*. 2003;52(12):2989-95.

16. Steele AM, Shields BM, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT, Pearson ER. Increased all-cause and cardiovascular mortality in monogenic diabetes as a result of mutations in the HNF1A gene. *Diabet Med.* 2010; 27(2):157-61.

Tabela 1: Características e comparação epidemiológica, clínica e laboratorial dos pacientes com DM 1 e MODY, São Luís, Maranhão, 2011.

Variáveis		DM 1 n=38	MODY n=20	p
Sexo	Masculino	34,21% (n = 13)	45,00% (n = 9)	0,4209
	Feminino	65,79% (n = 25)	55,00% (n = 11)	
Idade de início de doença		17,21 ± 9,38	24,35 ± 6,91	*0,0436
Tempo de doença		8,74 ± 6,23	9,25 ± 6,37	0,2099
IMC		22,52 ± 3,70	24,76 ± 4,77	0,5209
CA	Masculino	76,85 ± 8,69	88,11 ± 9,39	0,7145
	Feminino	75,24 ± 11,41	87,50 ± 11,91	
	Geral	75,79 ± 10,47	87,78 ± 10,58	*0,0003
Hemoglobina glicada		8,34 ± 3,62	6,98 ± 1,45	0,1058
Glicemia em jejum		158,05 ± 96,07	116,90 ± 38,48	0,0721
Dose total de insulina		0,998 ± 0,52	0,583 ± 0,31	*0,0090
HAS	Positivo	21,05% (n = 8)	25,00% (n = 5)	0,9909
	Negativo	78,95% (n = 30)	75,00% (n = 15)	
Dislipidemia	Positivo	36,84% (n = 14)	45,00% (n = 9)	0,5461
	Negativo	63,16% (n = 24)	55,00% (n = 11)	
Retinopatia	Positivo	34,21% (n = 13)	25,00% (n = 5)	0,6729
	Negativo	65,79% (n = 25)	75,00% (n = 15)	
Neuropatia	Positivo	26,32% (n = 10)	35,00% (n = 7)	0,4898
	Negativo	73,68% (n = 28)	65,00% (n = 13)	
Coronariopatia	Positivo	5,26% (n = 2)	15,00% (n = 3)	0,4451
	Negativo	94,74% (n = 36)	85,00% (n = 17)	
Nefropatia	Positivo	34,21% (n = 13)	55,00% (n = 11)	0,1265
	Negativo	65,79% (n = 25)	45,00% (n = 9)	