



**Estudio de mutaciones en el gen HNF4A en pacientes con características clínicas de MODY3. Análisis bioinformático de mutaciones en genes causantes de MODY1 y 3.**

**DIRECTOR:**

López, Ariel Pablo

**INVESTIGADORA:**

Kiernicki, María Cecilia

**COLABORADORES:**

De Dios, Alejandro; Trobo, Sofía Irene

**SEDE-LUGAR:**

Sede Buenos Aires

**PERIODO:**

-Inicio: 01/06/2016

-Finalización: 30/05/2017

**CONTACTO DEL DIRECTOR:**

aplopez@ffyb.uba.ar

# Tabla de contenido

<b>1. RESUMEN / ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>5</b>
<b>2.A. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, PREGUNTA PROBLEMA Y SU CONTEXTUALIZACIÓN.</b>	<b>5</b>
2.A.1. GENERALIDADES DE LA DIABETES.	5
2.A.2. CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES.	7
2.A.3. DIABETES TIPO MODY.	9
2.A.3. ¿POR QUÉ ES NECESARIO ENTONCES, REALIZAR EL ESTUDIO DEL GEN HNF4A EN LOS DIABÉTICOS CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE MODY3 PARA GENOTIPIFICARLOS?	17
<b>2.B. JUSTIFICACIÓN Y RELEVANCIA.</b>	<b>18</b>
<b>2.C. OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>19</b>
<b>2.D. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>20</b>
<b>2.E. MARCO CONCEPTUAL.</b>	<b>21</b>
<b>3. METODOLOGÍA.</b>	<b>22</b>
<b>3.A. TIPO DE ESTUDIO.</b>	<b>22</b>
<b>3.B. MUESTRA.</b>	<b>24</b>
<b>3.C. FUENTES E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.</b>	<b>24</b>
<b>3.D. DETALLE DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS.</b>	<b>25</b>
<b>3.E. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.</b>	<b>38</b>
<b>4. RESULTADOS.</b>	<b>39</b>
<b>5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.</b>	<b>49</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>53</b>
<b>7. ANEXOS.</b>	<b>58</b>
<b>7.1. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES DERIVADAS.</b>	<b>58</b>
<b>7.2. INFORME ECONÓMICO Y COMPROBANTES DE COMPRA.</b>	<b>60</b>

## 1. Resumen / Abstract

La diabetes tipo MODY es una forma monogénica de diabetes, que se presenta en individuos menores de 25 años, normopeso, no insulino dependiente y con herencia autosómica dominante.

Las alteraciones genéticas que determinan el desarrollo de los subtipos 1 y 3 de MODY, se producen en los genes HNF4A y HNF1A respectivamente, que codifican factores de transcripción relacionados con la síntesis y secreción de insulina. Estas mutaciones producen una desregulación del metabolismo de la insulina y constituyen la base genética de MODY.

Los pacientes con MODY1 y 3 tienen una clínica muy similar, siendo formas más severas por mayor descontrol metabólico, requieren tratamiento con drogas y tienen tendencia a las complicaciones crónicas de la enfermedad.

En base a ello se desprende la importancia de realizar un diagnóstico molecular diferencial para instaurar un correcto tratamiento y un adecuado asesoramiento genético familiar.

Contando con un grupo de pacientes con diagnóstico genético de MODY3 y otro grupo que cumple con las características clínicas, pero cuyo estudio genético para MODY3 ha sido negativo, se propuso poner a punto el estudio molecular del gen HNF4A y aplicarlo a aquellos pacientes que fueron clínicamente caracterizados como MODY3 pero que no presentaron mutaciones en el gen HNF1A. Esto nos permitiría diagnosticar en forma diferencial los subtipos 1 y 3 para poder instaurar un correcto tratamiento en estos pacientes, lo cual es inédito según la bibliografía consultada.

Se proyectó, además, analizar por bioinformática las mutaciones encontradas en el estudio y dar mayor sustento analítico al diagnóstico.

## 2. Introducción.

### 2.a. Planteamiento del problema, pregunta problema y su contextualización.

#### 2.a.1. Generalidades de la Diabetes.

La glucemia, es un parámetro que debe permanecer dentro de ciertos valores constantes a riesgo de producirse alteraciones a nivel tisular. Está determinada por un balance entre lo que se ingiere, sumado a la producción por parte del hígado y lo que se metaboliza en los tejidos por otro. En este balance intervienen múltiples factores, entre otros, hormonas como la insulina, enzimas como la glucoquinasa y factores de transcripción de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa.

La insulina es una proteína pequeña formada por dos cadenas de aminoácidos unidas por puentes disulfuro. Es producida como proinsulina y se modifica mediante una serie de procesos metabólicos hasta transformarse en insulina en el páncreas, más precisamente, en las células beta de los islotes de Langerhans. La glucosa entra a la célula beta del páncreas mediante el transportador específico GLUT-2, el cual tiene alta capacidad, pero baja afinidad para este glúcido. El transporte en definitiva permite equilibrar rápidamente la concentración de glucosa a ambos lados de la membrana celular. Una vez dentro la glucosa es fosforilada quedando disponible como sustrato de su metabolismo subsiguiente. Según la concentración de la misma en el medio, este paso puede ser realizado o bien por la enzima hexoquinasa, que responde a bajas concentraciones de glucosa en el medio o por la enzima glucoquinasa, que actúa a concentraciones más altas. A partir de allí, se desencadena, entre otros, la cascada de eventos en la vía glucolítica que culmina con la secreción de insulina al organismo. Por lo tanto, la producción de insulina es regulada por un mecanismo sensible a la glucemia.

La insulina causa dos efectos, por un lado, estimula la captación periférica de la glucosa, especialmente en tejido adiposo y músculo y por el otro, inhibe la salida de glucosa del hígado. En las células insulino dependientes, la insulina es necesaria para el ingreso de la glucosa. Con respecto a los hepatocitos, estos utilizan insulina, pero la función de ésta en esas células es diferente. La glucosa entra sin insulina, pero necesita de ella para la síntesis de glucoquinasa cuya función es fosforilar residuos de glucosa en hígado y páncreas preparando a este hidrato de carbono para los pasos posteriores.

Las funciones de la insulina son muchas y variadas, pero en síntesis podemos decir que favorece el metabolismo de la glucosa y disminuye la glucosa en la sangre por dos

mecanismos, por un lado, aumenta la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo y por otro disminuye la producción y liberación de glucosa por el hígado. En el hepatocito estimula la síntesis de la enzima glucoquinasa.

La Diabetes es una enfermedad metabólica multifactorial que se caracteriza por presentar diferentes grados de hiperglucemia desde leves como en algunas formas genéticas hasta severas como en la Diabetes de tipo 1. Las causas que determinan esta hiperglucemia se deben básicamente a alteraciones en la secreción de insulina debido a un deterioro en la masa celular o en la funcionalidad de la célula beta. En segundo término, a la resistencia periférica a la acción de la insulina localizada fundamentalmente en músculo, tejido adiposo e hígado. Y por último podemos mencionar a las causas debidas a procesos auto inmunes que tienen un efecto destructivo sobre las células beta del páncreas. Puede decirse que es un grupo de enfermedades metabólicas o síndromes con una manifestación orgánica en común que es la hiperglucemia.

Como resultado de la alteración en la acción biológica de la insulina se producen desequilibrios en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

Es por ese carácter multifactorial de su etiología y su fisiopatología que el desarrollo de la Diabetes es acentuadamente diferente entre los distintos enfermos y por lo tanto también lo serán las estrategias de prevención, así como los tratamientos y métodos de diagnóstico que deben necesariamente ser distintos y adecuarse a cada condición en particular. [1,2,3,4,5]

Esta enfermedad se puede presentar con síntomas característicos como sed, poliuria, visión borrosa y pérdida de peso. En sus formas más severas puede desarrollarse cetoacidosis que si no es tratada adecuadamente puede llevar incluso a la muerte. [1,2,3,4,5]

Como la hiperglucemia puede variar desde rangos muy leves hasta muy elevados los síntomas también serán variables de acuerdo con esto. En el caso de que sea leve, los síntomas pueden pasar desapercibidos hasta edades avanzadas del paciente en el que se hace el diagnóstico a raíz de observarse alteraciones en los análisis de rutina. Por el contrario, cuando los niveles son elevados, el diagnóstico se hace precozmente por las manifestaciones clínicas del paciente. [1,2,3,4,5]

El efecto de los altos niveles de glucosa circulante en un organismo es muy variado alcanzando a varios órganos produciendo entre otros efectos: ceguera, falla renal, neuropatías, úlceras, riesgo cardiovascular, enfermedades vasculares periféricas y cerebro vasculares.

Desde el punto de vista genético, la Diabetes es una enfermedad multifactorial o compleja, de etiología poligénica, en la cual el componente genético confiere una susceptibilidad. De esta manera la Diabetes no se desarrolla a menos que múltiples genes que confieren características de susceptibilidad en interacción con factores ambientales la desencadenen, salvo los casos específicos de los determinados subtipos en los cuales las alteraciones genéticas son causa directa de la enfermedad teniendo el factor ambiental mucho menor contribución. [1,2,3,4,5]

La prevalencia de la enfermedad difiere entre las diferentes poblaciones. Es de alrededor del 7% en nuestro país al igual que en otras poblaciones de origen caucásico, contabilizándose frecuencias más altas en los afroamericanos o en los grupos hispanos que viven en EE.UU. [6,7,8]

La Diabetes se está transformando de una enfermedad tradicionalmente considerada minoritaria en la población, a una de las más prevalentes incluso a nivel mundial ya que es la enfermedad no comunicable más frecuente y es la cuarta o quinta causa de muerte, según el caso, en los países desarrollados. [6,7,8]

Según la declaración de las Américas sobre la Diabetes, en el continente americano hay alrededor de 30 millones de diabéticos, es decir la cuarta parte del total mundial. Se calcula que habrá solo en América 65 millones aproximadamente para el 2025. Según las estimaciones más pesimistas los enfermos diabéticos serían a nivel mundial, de alrededor de 300 millones de diabéticos para el año 2025. [6,7,8]

## 2.a.2. Clasificación y diagnóstico de la Diabetes.

La clasificación de la Diabetes se encuentra en constante revisión, ya que evidentemente se suman los hechos de que sea una enfermedad compleja y poligénica además de los avances que se producen periódicamente en su estudio. [1,2,3,4,5]

Actualmente se rige por la determinación de las causas etiológicas, las cuales representan procesos que pueden resultar en los distintos tipos de Diabetes, a saber:

➡ Diabetes tipo 1 o insulino dependiente (DM1): se produce por destrucción autoinmune de la célula beta del páncreas con deficiencia grave o absoluta de insulina.

➡ Diabetes tipo 2 o no insulino dependiente (DM2): se produce por insulino resistencia y/o secreción anormal de insulina, con predominio de una u otra.

➤ Diabetes gestacional: cualquier grado de intolerancia a la glucosa de comienzo o reconocimiento durante el embarazo de etiología normalmente desconocida.

➤ Otros tipos específicos: por mutaciones en genes específicos, como ser **MODY** u otros debido a causas específicas desconocidas.

La Diabetes tipo 1 se caracteriza por destrucción de las células beta del páncreas por un proceso autoinmune que conduce desde una deficiencia parcial hasta absoluta de la producción de insulina. Su inicio es rápido, de días a pocas semanas y alrededor del 95% de las personas que desarrollan este tipo de Diabetes lo hacen antes de los 25 años. No hay diferencias de incidencia entre los sexos, pero si existe una mayor prevalencia entre individuos caucásicos. Representan entre el 5 y el 10% del total de pacientes diabéticos.

Usualmente se encuentra un historial familiar de la enfermedad o de otras enfermedades relacionadas como ser la enfermedad Celíaca, la Tiroiditis de Hashimoto o la enfermedad de Addison todas ellas de origen auto inmune. [6,7,8]

Es bien conocida la relación que existe en muchos de estos pacientes con respecto a la enfermedad y ciertos alelos de susceptibilidad en la región del complejo mayor de histocompatibilidad o HLA y más específicamente con alelos de los genes DQA y DQB.

En cuanto al diagnóstico de Diabetes según el boletín de la A.D.A. de Enero del año 2014, se puede realizar considerando que se confirme alguna de las siguientes tres formas de diagnóstico, siendo que solamente el primero de ellos al ser repetido en un día posterior resulte de igual forma alterado: [1]

➤ Glucosa en ayunas (con al menos 8hs sin ingesta calórica) de 126mg/% o mayor.

➤ Síntomas de hiperglucemia y un resultado de glucemia en un análisis casual (sin ayuno de ninguna clase) de 200mg/% o mayor. Los síntomas clásicos son poliuria, polidipsia y pérdida de peso sin razón aparente.

➤ Glucemia de 200mg/% o mayor durante un ensayo de tolerancia oral a la glucosa a las 2hs, realizado según recomendaciones de la World Health Organization.

### 2.a.3. Diabetes tipo MODY.

La Diabetes del adulto de comienzo en jóvenes o MODY por sus siglas en inglés de “Maturity Onset Diabetes of the Young” es una forma de diabetes monogénica que tiene una presentación heterogénea desde el punto de vista genético y clínico, pero que se puede agrupar como un conjunto y definir separadamente de los demás tipos de diabetes más frecuentes como la diabetes tipo 1 y tipo 2, por una serie de características comunes. [9,10,11]

Típicamente estos pacientes presentan por un lado una temprana edad de debut siendo habitualmente antes de los 25 años incluso durante la adolescencia o la infancia, cursan con normopeso y con otras características asociadas. Dentro de ellas podemos encontrar un grado de disfunción de la célula beta pancreática, la ausencia de auto anticuerpos anti células beta, la carencia de resistencia periférica a la insulina, la independencia de insulina al debut y un tipo de herencia autosómica dominante. [9,10,11]

Con respecto al metabolismo en estos pacientes, se pueden observar defectos en la secreción de insulina mediada por estimulación de la glucosa a nivel pancreático y desde el punto de vista genético, al presentarse con herencia autosómica dominante, se describen individuos afectados en por lo menos tres generaciones de una misma familia. [9,10,11]

La ausencia de auto anticuerpos en los pacientes diabéticos MODY permite diferenciar estas formas de la Diabetes tipo 1 en la cual existe una destrucción de las células beta pancreáticas por parte del sistema inmune celular debido a una pérdida de la tolerancia a lo propio (tabla 1). [12]

Características	Diabetes tipo1	MODY Clásico	Diabetes tipo2
Edad de comienzo	Pico entre los 5 y los 15 años	< 25 años	Adolescentes, adultos

Comienzo	Agudo, severo, necesidad de insulina	Insidioso, sin necesidad de insulina	Insidioso, sin necesidad de insulina
Autoinmunidad	Presente, muy común	Ausente, muy infrecuente	Ausente, infrecuente
Curso a largo plazo	Insulino-dependiente	No insulino-dependiente	No insulino-dependiente
Obesidad	Infrecuente	Infrecuente	>90%
Familiares de 1° grado afectados	Alrededor del 15%	100% (excepto de novo)	Variable
Herencia	No mendeliana, esporádica	Autosómica Dominante	No mendeliana, pero familiar
N° de genes	Poligénica	Monogénica	Poligénica

Tabla 1: comparativa de las características entre los tipos clásicos de Diabetes y MODY, mostrando sus similitudes y diferencias más significativas.

La Diabetes tipo MODY se presenta con esta característica heterogénea por su etiología particular en la cual se producen alteraciones en distintos genes dando lugar así a diferentes subtipos por lo que se considera que son formas monogénicas dentro de una enfermedad de contexto poligénico. [10,11,12] En ese sentido, actualmente se han descrito 14 formas diferentes determinando así los distintos subtipos de MODY a consecuencia de alteraciones en sendos genes. Estos 14 subtipos corresponden aproximadamente al 80% de todos los casos de MODY clínicamente caracterizados, siendo el 20% restante de causa genética desconocida y denominados genéricamente como MODYX, aunque clínicamente hayan sido caracterizados como MODY. [13]

Dentro de estos subtipos tres son los más frecuentes según los diversos trabajos publicados. Estos son los subtipos 1, 2 y 3 que se caracterizan por originarse por mutaciones en el gen del factor nuclear hepático 4 alfa que codifica para un factor de transcripción que

regula la síntesis de insulina (HNF4A/MODY1), en el gen de la glucoquinasa, enzima relacionada con el metabolismo de la glucosa ya descrita mas arriba(GCK/MODY2) y en el gen del factor nuclear hepático 1 alfa que codifica para otro de los factores de transcripción que regulan la síntesis de insulina (HNF1A/MODY3) respectivamente (tabla 2). [13,14,15]

MODY1	Por mutación heterocigota en el gen del factor nuclear 4 -alfa del hepatocito (HNF4A; 600281) ubicado en el cromosoma 20.
MODY2	Por mutación heterocigota en el gen de la glucoquinasa (GCK; 138079) ubicado en el cromosoma 7.
MODY3	Por mutación heterocigota en el factor nuclear 1-alfa del hepatocito (HNF1A; 142410) ubicado en el cromosoma 12q24.2.

Tabla 2: los subtipos más frecuentes de MODY y sus causas etiológicas junto con la ubicación del gen involucrado respectivo.

Los pacientes con Diabetes tipo MODY2 desarrollan la enfermedad antes de la pubertad y presentan un descontrol metabólico leve y estable que es generalmente controlado con dieta o con antidiabéticos orales en contadas ocasiones. Además, estos pacientes en general no desarrollan complicaciones crónicas tanto micro como macro vasculares. Este último dato está reflejado en el hecho de que en estos pacientes los valores de HbA1c se mantienen dentro del rango normal o levemente por encima del mismo, y en este sentido, los tratamientos raramente derivan en el uso de insulina o agentes hipoglucemiantes orales. Es común que estos pacientes sean diagnosticados como diabéticos tipo 2 y sean tratados de tal manera.

En su revisión de MODY Fajans y colaboradores describieron que los mecanismos fisiopatológicos de MODY1 y MODY3 son muy similares siendo que el gen HNF4A regula la expresión de HNF1A. Los pacientes con mutaciones en estos genes pueden presentarse con una forma leve de diabetes, pero con concentraciones de glucosa significativamente mayor en plasma dos horas después de la administración de glucosa de lo que lo hacen las personas con mutaciones en el gen de la glucoquinasa (tabla 3). [11]

La hiperglucemia en pacientes con MODY1 y MODY3 tiende a aumentar con el tiempo, lo que resulta en la necesidad de tratamiento con fármacos hipoglucemiantes orales o insulina en muchos de estos pacientes (30 a 40% requiere insulina). [11,13,15,16]

Características	MODY1	MODY2	MODY3
Locus genético	20q	7p	12q
Proteína	HNF 4 alfa	GCK	HNF 1 alfa
Prevalencia	Baja	10-65%	20-75%
Edad del diagnóstico	Post-pubertad	Niñez	Post-pubertad
Defecto primario	Páncreas, hígado	Páncreas, hígado	Páncreas, riñón
Gravedad de la diabetes	Severa	Leve	Severa
Complicaciones	Frecuente	Rara	Frecuente
Tratamiento	HPO/ insulina	Dieta/ ejercicio	HPO/ insulina

Tabla 3: características clínicas típicas de los tres subtipos de MODY más frecuentes.

Los factores de transcripción son proteínas que regulan la transcripción de los genes, es decir, intervienen en su expresión. Para poder unirse al promotor deben tener una estructura conservada. Si el gen que produce este factor de transcripción está alterado por mutaciones entonces la proteína resultante no se va a poder unir al promotor o lo va a hacer deficientemente por lo cual la función de regulación de la síntesis de la proteína codificada por el gen regulado va a estar alterada. [17,18]

En el caso de los factores HNF4A y HNF1A, al no ser adecuada la proteína en cuanto a su estructura que posee los dominios de unión al promotor del gen de la insulina, la respuesta a la ingesta de glucosa estará alterada provocando que no se libere la cantidad de insulina

adecuada. El defecto metabólico en consecuencia se encuentra a nivel de la estimulación de la síntesis de insulina desencadenando un fenotipo diabético.

La presencia de mutaciones a nivel del gen del factor de transcripción HNF1A, producirán una proteína alterada en su estructura que luego no se podrá unir correctamente al promotor de la insulina. Por este motivo, las alteraciones en el gen HNF1A producirán el desarrollo de diabetes, ya que la respuesta a la síntesis de insulina estará alterada pero no a nivel del gen de la insulina sino a nivel del gen que regula su expresión a través de su promotor. [17,18,19]

A su vez el gen HNF1a tiene su propio promotor y este promotor está regulado por el factor de transcripción HNF4A. Entonces las alteraciones en el gen HNF4A van a producir una proteína resultante deficiente, que no se podrá unir correctamente al promotor del gen HNF1A, no sintetizándose la cantidad adecuada de proteína HNF1A (factor de transcripción) que a su vez no se unirá al promotor del gen de la insulina, en este caso no porque este alterado el factor en sí, sino porque no se sintetiza en la cantidad adecuada. Entonces tanto las mutaciones en el gen HNF4A y HNF1A van a producir en definitiva una mala respuesta a la síntesis de insulina. [19,20,21]

Asimismo, como la proteína HNF4A se une tanto directamente en forma de homodímero como en forma de heterodímero con la proteína HNF1A al promotor del gen de la insulina, en caso de registrarse alteraciones en el gen HNF4A, se encontrará alterada la secreción de insulina por esas vías.

Entonces todos los factores de transcripción que tengan una relación con este mecanismo de síntesis de insulina cuando estén alterados van a producir algún tipo de MODY, ya que cuando hay un aumento de glucosa no hay una respuesta adecuada en cuanto a la cantidad de insulina requerida, aumenta la glucosa en circulación y se desarrolla diabetes MODY en estos pacientes. [21,22,23]

Por este motivo si bien los genes afectados son distintos y cumplen diferentes funciones, como están dentro de la misma cascada de regulación, las características clínicas y fenotípicas de la diabetes MODY1 y MODY3 serán bastante similares. [24,25]

El gen HNF4A puede regular al promotor del gen HNF1A y a su vez en forma directa puede regular al gen de la insulina, tiene esa doble función (Figura 1).

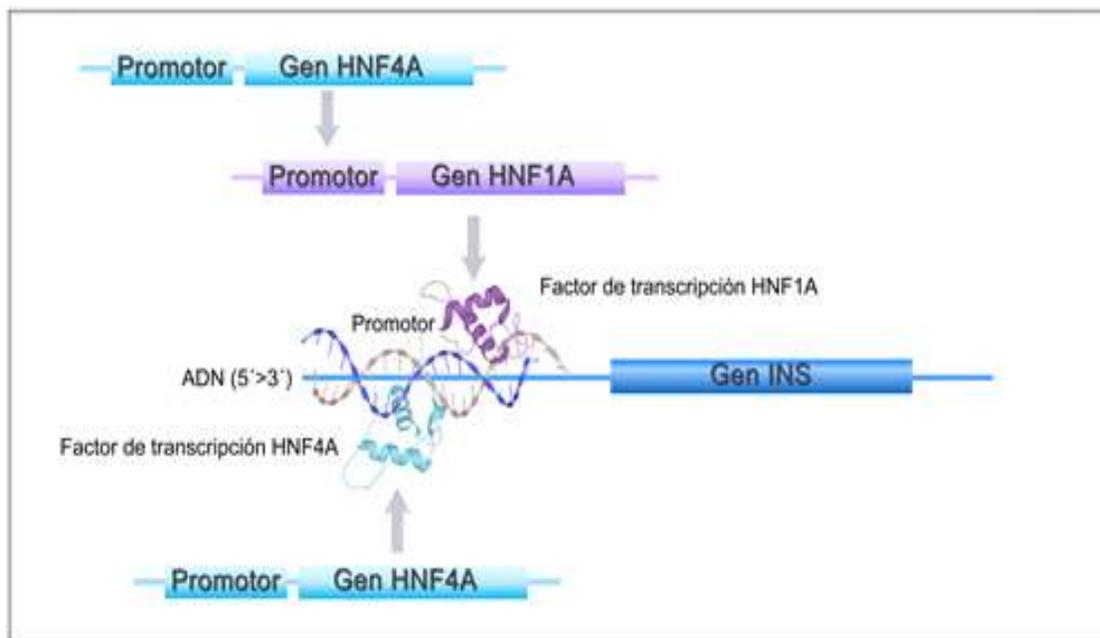


Figura 1: esquema de la relación efectora entre los productos proteicos de los genes de MODY1 y MODY3 y el efecto de ambos sobre la expresión del gen de la insulina.

Además, estas dos formas de MODY se asocian con una disminución progresiva de la secreción de insulina.

Los pacientes con MODY1 o MODY3 pueden tener el espectro completo de las complicaciones microvasculares de la diabetes, tan comunes en estos pacientes como en los pacientes con diabetes tipo 1, ajustado según la duración de la diabetes y el grado de control de la glucemia. [11,13,15]

La deficiencia de la actividad del HNF4A resultante de las mutaciones en este gen puede afectar a la función de las células beta dentro de los islotes pancreáticos. [11,13,15]

Estos pacientes tienen una disminución de la absorción renal de la glucosa (es decir, un umbral renal bajo para la glucosa) por lo cual presentan glucosuria. De la misma forma se encuentra afectada la biosíntesis de triglicéridos y de apolipoproteína lo cual se asocia con

una reducción del 50% en las concentraciones de triglicéridos en suero y una reducción del 25% en las concentraciones séricas de ciertas apolipoproteínas.

Tanto los MODY tipo 1 como los 3, por su forma clínica de presentación en ciertas oportunidades son diagnosticados tempranamente como diabéticos tipo 1 y tratados en consecuencia, pero difieren de estos por su evolución y etiología, ya que requieren dosis bajas de insulina y no desarrollan cetoacidosis diabética al debut. Esto contrasta claramente con respecto a los pacientes con diabetes tipo 1 clásica ya que ellos requieren insulina ya desde el diagnóstico. [11,13,15]

La prevalencia de la Diabetes tipo MODY no está claramente determinada, ya que muchas veces la enfermedad no es diagnosticada hasta la edad adulta y otras veces no se puede establecer fácilmente el carácter autosómico dominante por carecerse del dato familiar.

Muy probablemente el hecho que se hayan tomado criterios diversos para el reclutamiento de los pacientes a analizar produzca una dispersión de datos en este sentido, haciendo que no haya uniformidad de valores en las distintas poblaciones analizadas.

De los estudios realizados en este campo se ha establecido que la frecuencia de MODY entre todos los tipos de Diabetes en las poblaciones de Europa sería del 1 al 2%. Sin embargo los datos de las prevalencias conocidas son discordantes, no hay uniformidad numérica ni de criterios a lo largo de los diferentes estudios, incluso entre estudios hechos en un mismo país (Tabla 4). [29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40]

Tipo de MODY	MODY1	MODY2	MODY3	MODY4	MODY5	MODY6
Frecuencia	<5%	20-50%	20-50%	<1%	<5%	<1%

Tabla 4: frecuencias relativas de los tipos de MODY 1 a 6 según diversos estudios realizados en distintas poblaciones.

Se han identificado gran cantidad y diversos tipos de mutaciones en los genes HNF4A, GCK y HNF1A. Estas incluyen mutaciones con pérdida de sentido, sin sentido, en regiones que afectan el splicing, inserciones, duplicaciones, deleciones pequeñas y en las regiones de los promotores. Incluso recientemente se han reportado deleciones más amplias y hasta completas. Estas mutaciones serían en principio responsables del desarrollo de la enfermedad en los individuos que las portan, lo cual ha sido demostrado en trabajos previos. [41]

Sumando las características de gen único y con alta penetrancia al hecho que la presentación es a temprana edad y que existe una alta correlación entre genotipo y fenotipo dentro de las familias, se ha llegado a denominar a la Diabetes tipo MODY el paradigma de la Diabetes tipo 2 e indudablemente se ha transformado paulatinamente en un modelo genético atractivo para el estudio de la Diabetes Mellitus no insulino dependiente llevando a un mejor conocimiento de sus mecanismos genéticos y fisiopatológicos.

En base a lo anterior se desprende la importancia de realizar un diagnóstico temprano molecular para poder instaurar un correcto tratamiento y un adecuado asesoramiento genético familiar según el tipo de diabetes presente. Y en conjunto con ello, contribuir con los datos de prevalencia en nuestro medio los cuales no han sido reportados aún.

El actual razonamiento más utilizado para el diagnóstico de diabetes tipo MODY es el criterio clínico recomendado por la ADA (American Diabetes Association). [1] El mismo recomienda analizar los parámetros clínicos presentes en el individuo ya comentados más arriba. Según esos criterios los pacientes pueden ser caracterizados según un genotipo más probable y analizados genéticamente en busca de mutaciones en alguno de los genes nombrados según esa clasificación previa. En función de ese criterio los pacientes ya diagnosticados como diabéticos son analizados para tratar de determinar si se los puede clasificar dentro de las diabetes clásicas o dentro de estas formas monogénicas.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que el hallazgo de mutaciones en estos genes no siempre garantiza la asociación con el desarrollo del fenotipo clínico. Existen variantes polimórficas o no polimórficas que no son deletéreas por lo cual es necesario el análisis por

medios informáticos en toda la extensión posible ya que ello aporta más datos al conocimiento y al diagnóstico preciso en estos individuos. [42]

Este tipo de estudios complementan a los análisis de expresión por metodologías de biología molecular que son extremadamente costosos y laboriosos ya que hoy en día se cuenta con medios adecuados tanto de hardware como de software que han evolucionado enormemente y permiten recrear con mucha aproximación las condiciones que se pueden encontrar *in vivo*.

### 2.a.3. ¿Por qué es necesario entonces, realizar el estudio del gen HNF4A en los Diabéticos con características clínicas de MODY3 para genotipificarlos?

Cuando al estudiar pacientes diferenciados como MODY3 no se encuentran mutaciones en el gen HNF1A, los pacientes quedan clínicamente caracterizados como diabéticos, pero genotípicamente irresueltos. Pero siendo que ambos tipos de Diabetes, MODY3 y MODY1 tienen características clínicas comunes y dado que se pueden confundir, es importante determinar si aquellos candidatos a ser MODY3 pero que no han podido ser genotipificados sean en realidad pacientes con mutaciones en el gen HNF4A que queden enmascarados y deban ser diagnosticados como MODY1.

La importancia del correcto diagnóstico está dada entonces, porque estos pacientes pueden ser erróneamente diagnosticados como diabéticos tipo 1 clásico y tratados en consecuencia siendo que requieren un tratamiento específico siendo que es contraproducente para su salud tratarlos como tipo 1.

Por otro lado, todas las variantes que son encontradas en el ADN con respecto a las secuencias consenso deben ser analizadas de varias formas para aportar mayor peso a la asignación como causantes de la patología. Esto es en función que no todas las variantes encontradas serán patogénicas, incluso siendo mutaciones con cambio de sentido de traducción en la proteína.

Como conclusión, en primer término, se debe realizar un análisis del tipo de mutación, en segundo término, buscar en la bibliografía si existe más información previa al respecto de

la alteración encontrada y en último término realizar un análisis por medios bioinformáticos en busca de la mayor certeza posible para realizar el diagnóstico.

## **2.b. Justificación y relevancia.**

Hasta el momento del inicio de nuestro trabajo no se había estudiado en el país, de la manera planteada en este estudio, a los Diabéticos clínicamente caracterizados como tipo MODY3 en busca de mutaciones en el gen HNF4A responsable del desarrollo del subtipo 1. Los pacientes caracterizados de esa manera eran estudiados genéticamente por rastreo de mutaciones presentes en el gen HNF1A responsable de ese subtipo de MODY. Al no hallarse mutaciones eran catalogados como MODYX, es decir, con las condiciones clínicas típicas de MODY, pero sin diagnóstico molecular positivo.

Estos pacientes no diagnosticados, a criterio de los médicos derivantes serían tratados como MODY3 sin importar la falta de diagnóstico genético o incluso como Diabéticos tipo 1 clásicos y rápidamente insulinizados, lo cual constituye un grave error en el sentido que estos pacientes generalmente no requieren dosis de insulina al debut e incluso hasta edades adultas. La aplicación del tratamiento errado conlleva un deterioro prematuro de la función pancreática endócrina de los pacientes con el consiguiente deterioro de su salud y calidad de vida.

En la literatura se plantea el estudio de los pacientes según sus características bioquímicas diferenciales directamente para el rastreo de mutaciones en el gen HNF4A si los resultados orientan clínicamente la sospecha de MODY1 o del gen HNF1A si es para MODY3.

Sin embargo, nuestro planteo era analizar los pacientes MODY3 como si fueran MODY1 ya que guardan características bioquímicas en común que pueden llevar a errores de caracterización. En vez de catalogarlos como MODYX al no encontrar alteraciones genéticas compatibles estudiar primero la presencia de mutaciones en el otro gen y en tal caso diagnosticarlos correctamente.

En la actualidad existen metodologías de secuenciación llamadas de nueva generación las cuales pueden ser usadas para analizar muchos genes en forma conjunta, aumentando

dramáticamente la posibilidad de hacer un diagnóstico genético en estos pacientes. No solo de las variantes más frecuentes como es el caso del presente trabajo, sino también de las otras menos frecuentes, pero con clínica de MODY y que son causadas por otros genes cuya función también está relacionada con la síntesis y liberación de la insulina por parte del páncreas.

Sin embargo, estas metodologías son de un alto costo por lo cual su utilización es difícil en nuestro medio, ya que la inversión inicial y el gasto por paciente que se requiere es muy importante. Es por ello por lo que en la actualidad la opción de elección es hacer el estudio por secuenciación automatizada de cada gen sospechado por separado y en esta forma secuencial.

En principio analizar el gen de MODY3 ya que se proyecta como el más frecuente y en caso negativo analizar el gen de MODY1 que, aunque es menos frecuente tiene un peso no despreciable en el total de pacientes MODY.

Por consiguiente, los postulados anteriores constituyeron justificación suficiente para realizar el presente proyecto y brindaban una base de relevancia adecuada dadas las implicancias para la salud de los pacientes estudiados o por estudiar en el futuro, incluyendo a sus familiares que podrían estar afectados o ser portadores de mutaciones dado el carácter hereditario autosómico dominante de la patología.

## **2.c. Objetivo general.**

Dadas las características clínicas tan semejantes de los subtipos 1 y 3 de MODY, se pretendió determinar si los pacientes clasificados clínicamente como MODY3 según las recomendaciones de la ADA (American Diabetes Association) pero que no habían podido ser genotipificados en ese sentido por no presentar mutaciones en el gen HNF1A, en realidad presentaban mutaciones en el gen HNF4A y deberían ser reclasificados y tratados como MODY1 en vez de como MODY3 o diabéticos tipo 1.

## 2.d. Objetivos específicos.

- Se pretendía desarrollar técnicamente la metodología que permitiera estudiar la presencia de mutaciones en el gen HNF4A para así diagnosticar correctamente el tipo de Diabetes a un grupo de pacientes clínicamente caracterizados como MODY3, por medio de técnicas de Biología Molecular.
- Incluir en estos estudios a pacientes que no tienen antecedentes familiares de la patología siendo que en nuestra experiencia existe un alto porcentaje de pacientes que presentan mutaciones *de novo*, que según las recomendaciones de la ADA no son estudiados, para poder lograr un correcto diagnóstico en ellos también.
- Estudiar por medios bioinformáticos las características de las variantes que sean encontradas para así poder dar más sustento a la asignación de causalidad de Diabetes a las mismas. Tanto a las que fueran encontradas en esta nueva etapa, como a las ya reportadas en el estudio genético previo de pacientes clínicamente MODY3 que si habían dado positiva la genotipificación.
- Dar a los alumnos de la carrera un marco de referencia en cuanto a que pudieran acompañar el procedimiento completo desde la caracterización clínica de los pacientes con síntomas de Diabetes según los criterios mundialmente consensuados con modificaciones introducidas por nuestro grupo, hasta lograr el diagnóstico correcto final, que permitiera instaurar en los pacientes el mejor tratamiento posible y el asesoramiento familiar más adecuado.
- Por último, llegado el caso hacer el seguimiento de los pacientes que se comienzan a tratar o que eventualmente ya tienen tratamiento y son reenfocados en función del diagnóstico diferencial por parte de nuestro laboratorio, para poder apreciar la mejora en sus condiciones metabólicas y sus parámetros bioquímicos.

## 2.e. Marco conceptual.

Los pacientes diabéticos que presentan las características clínicas típicas de Diabetes tipo 1 son diagnosticados tempranamente y se les aplica un tratamiento específico el cual se debe ir ajustando en función de la respuesta individual.

En cambio, los pacientes tipo MODY, tanto los tipo 1 como los 3, presentan tipologías semejantes al debut a los anteriores salvo básicamente que no presentan autoanticuerpos y si en cambio presentan habitualmente una historia familiar de Diabetes, dada la característica de herencia mendeliana.

Es habitual, por consiguiente, que los pacientes MODY tipos 1 y 3 sean catalogados como diabéticos tipo 1 clásicos sin tener en cuenta esas características diferenciales y comiencen un curso de tratamiento y automonitoreo que no es el más adecuado. [9,12]

Ello a la larga determina un deterioro mucho más acelerado de la respuesta pancreática en estos pacientes con el consiguiente deterioro de la calidad de vida y la aparición más temprana de complicaciones microvasculares.

Respecto a los tipos de MODY1 y 3 en particular si bien los productos de ambos genes afectados intervienen en la respuesta insulínica vía síntesis y liberación, también lo hacen regulando otras vías metabólicas por lo cual el efecto de mutaciones presentes en cada gen no es exactamente igual. Respecto de la regulación de la síntesis de insulina el efecto es similar y se enmascara uno con el otro, mientras que los efectos a otros niveles celulares son variados.

Es por ello por lo que las alteraciones en cualquiera de esos genes producen un cuadro diabético similar en los individuos que las portan, prácticamente imposible de diferenciar desde la clínica.

Dado que en las distintas poblaciones en las cuales se ha estudiado la prevalencia de cada tipo de MODY se ha visto que el tipo 3 es significativamente más frecuente que el tipo 1 y que la metodología de uso más corriente implica estudiar cada gen por separado, siempre se inicia el estudio por ese primer tipo considerando más probable de encontrar. Pero en el

caso de no hallarse mutaciones que originen el tipo 3 el curso ideal de estudio de estos pacientes debe ser buscar mutaciones en el gen responsable del tipo 1 menos frecuente.

Esto por razones económicas no siempre se realiza por lo cual los pacientes a lo sumo quedan catalogados como MODYX, es decir con características clínicas típicas, pero sin genotipificación positiva. En cuyo caso son tratados en forma genérica, en función de su respuesta metabólica. [1,13]

Por otro lado, y muy importante, según las recomendaciones de la ADA para la caracterización de estos pacientes se requiere cumplir una serie de requisitos entre los cuales se incluye contar con antecedentes familiares en al menos dos generaciones anteriores, lo cual no se cumple en el caso de mutaciones *de novo* en los individuos. En nuestro caso estudiamos a todos por igual aún sin antecedentes familiares mientras cumplan con la caracterización clínica típica. Esto nos ha reportado la sorpresa que existe un porcentaje importante de individuos que tienen esa característica y son diagnosticados por nuestro grupo como MODY que de otra manera terminan sin ser estudiados. [1]

Es indispensable por lo tanto adecuar los algoritmos de diagnóstico a estas particularidades dada la gran importancia que sobrelleva el correcto diagnóstico genético en estos individuos para poder instaurar un correcto tratamiento y un adecuado asesoramiento genético familiar. Y en conjunto con ello, contribuir con los datos de prevalencia en nuestro medio los cuales no han sido reportados aún.

### **3. Metodología.**

#### **3.a. Tipo de estudio.**

La Diabetes tipo MODY 3 según ha sido publicado en distintas poblaciones mundiales, es uno de los subtipos más frecuentes dentro de las diabetes monogénicas. Tiene características clínicas diferenciales que se pueden, según un criterio acordado por la ADA (American Diabetes Association) servir para hacer una caracterización clínica.

Una vez realizada esa caracterización se procede a estudiar el gen HNF1A el cual ya ha sido ampliamente asociado con el desarrollo de MODY3. Llegado el caso y si se encuentran

mutaciones en el gen se determina el diagnóstico tratando siempre de corroborarlo por medios bioinformáticos u otro tipo de estudios complementarios. [42]

Adicionalmente, la Diabetes tipo MODY1 es relativamente frecuente y cursa con sintomatología muy similar al tipo 3 por lo cual es difícil determinar a priori sin estudios moleculares si el paciente tiene uno u otro tipo. Este último tipo de Diabetes se produce por mutaciones en el gen HNF4A.

Todas las variantes que son encontradas en el ADN con respecto a las secuencias consenso deben ser analizadas de varias formas para aportar mayor peso a la asignación como causantes de la patología. En primer término, realizar un análisis del tipo de mutación, en segundo término, buscar en la bibliografía si existe más información previa al respecto de la alteración encontrada y en ultimo termino realizar un análisis por medios bioinformáticos en busca de la mayor certeza posible para realizar el diagnóstico.

Las muestras analizadas consistieron en ADN obtenido de sangre de los donantes que se obtuvieron por punción venosa realizada por un médico especialista, por las metodologías de uso común del laboratorio de biología molecular. Este ADN fue utilizado para el estudio genético.

La metodología consistió en realizar amplificaciones por el método de PCR y posteriormente efectuar el estudio por secuenciación automatizada de las regiones codificantes y de la región promotora del gen HNF4A en por lo menos 25 pacientes ya caracterizados como MODY3 por sus signos clínicos, pero que no habían presentado mutaciones en el gen HNF1A que fue lo originalmente sospechado.

Las mutaciones o variantes que fueron halladas en el gen en estudio se estudiaron por diversas herramientas bioinformáticas según fuera el caso, a lo cual se sumaron las mutaciones ya descubiertas por nuestro grupo en un trabajo previo de rastreo de mutaciones sobre el gen HNF1A.

### **3.b. Muestra.**

La muestra utilizada consistió en un grupo de 25 pacientes clínicamente caracterizados como MODY3 según los estudios bioquímicos, antropométricos y por sus antecedentes familiares, que luego de ser estudiados para tratar de encontrar la causa genética en el gen respectivo no se les encontró ninguna alteración que pudiera ser asignada como causal de la patología.

Estos pacientes concurren espontáneamente o por derivación de profesionales intervinientes, al Programa de Biología Molecular perteneciente al servicio de Genética del Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires.

Una vez confeccionadas las historias clínicas y recibidos los resultados de laboratorio bioquímico, incluyendo la falta de autoanticuerpos, se definió una caracterización clínica. Según ella se procedió el estudio del gen respectivo resultando en la falta de alteraciones que indiquen relación con el desarrollo de Diabetes.

A partir de allí fueron incluidos como pacientes a estudiar en el presente trabajo.

### **3.c. Fuentes e instrumento de recolección de datos.**

Las muestras por analizar consistieron en ADN obtenido de sangre de los donantes que se obtuvieron por punción venosa realizada por un médico especialista, idóneo en la práctica de extracción de sangre. A partir de la muestra de sangre se purificó el ADN propio del paciente por las metodologías de uso común del laboratorio de biología molecular el cual fue utilizado para el estudio genético.

Las determinaciones para establecer la presencia de las alteraciones genéticas de los pacientes se realizaron con metodologías propias ya reconocidas y utilizadas habitualmente en la práctica bioquímica.

Se realizaron estudios de secuenciación de las regiones codificantes y de la región promotora del gen HNF4A en 25 pacientes ya caracterizados como MODY3 por sus signos

clínicos, pero que no habían presentado mutaciones en el gen HNF1A que fue lo originalmente sospechado.

Se pusieron a punto las reacciones de amplificación utilizando los primers descritos en la bibliografía consultada salvo los de diseño propio que fueron realizados para poder mejorar la reacción de amplificación.

Todas las mutaciones que fueron halladas en el gen en estudio fueron analizadas por diversas herramientas bioinformáticas según fuera el caso.

### **3.d. Detalle de las técnicas empleadas.**

El esquema general de trabajo fue el siguiente:

- 1) Obtención de muestras de sangre periférica de pacientes que cumplieran con el criterio clínico de inclusión en el trabajo.
- 2) Purificación de ADN a partir de las muestras de sangre periférica por la técnica de proteinasa K o CTAB.
- 3) Amplificación de los fragmentos de las regiones codificantes de los genes y de sus regiones adyacentes por medio de la técnica de PCR.
- 5) Secuenciación de los fragmentos amplificados para identificar la alteración genética presente.
- 6) Análisis de electroferogramas.
- 7) Análisis de variantes encontradas, tanto con respecto a la bibliografía como por medios bioinformáticos.

Se recolectaron muestras de 72 pacientes que cumplieran con los criterios clínicos de inclusión predeterminados los que podemos considerar como no relacionados, que cumplieran con la caracterización clínica de MODY3. Estos pacientes presentaban una edad promedio de 19,70 años al diagnóstico, variando en el rango de 4 a 60 años.

A todos ellos se les estudió el gen HNF1A en busca del diagnóstico de MODY3 en primera instancia, lográndose en solo 19 casos.

Del resto de los pacientes sin genotipificación se seleccionaron los 25 más representativos según características clínicas. Estos últimos fueron incluidos en el presente estudio.

Los criterios clínicos de inclusión predeterminados utilizados fueron los recomendados por la Asociación Americana de Diabetes:

- 1) Tener o no antecedentes familiares de Diabetes con al menos un familiar con caracterización clínica de Diabetes y que se observara un tipo de herencia autosómica dominante familiar.
- 2) En general que la edad de aparición de la enfermedad fuera temprana, antes de los 35 años, aunque según los signos se incluyeron pacientes de mayor edad.
- 3) Haberse encontrado una intolerancia oral a la glucosa o una hiperglucemia o una alteración de la glucemia ambas en ayunas por los medios bioquímicos estandarizados adecuados.
- 4) Ausencia de auto anticuerpos anti-células beta pancreáticas.

A todos los pacientes se les analizó la presencia o no de GADA, IAA y IA2A (siglas en inglés de auto anticuerpos anti-ácido glutámico decarboxilasa, anti insulina y anti fosfatasa 2A respectivamente) para descartar el diagnóstico de Diabetes tipo 1 en estos individuos.

Los estudios bioquímicos de glucemia y hemoglobina A1c fueron llevados a cabo por medio de procedimientos estandarizados de laboratorio de rutina mientras que los estudios de auto anticuerpos fueron hechos por medio de ensayos de radio ligandos.

Se extrajo ADN de leucocitos de sangre periférica por la técnica por la técnica de CTAB según el procedimiento que se detalla a continuación.

Se tomaron 4ml de sangre y se realizaron lavados con 1 volumen (vol) de Tris 10mM y EDTA 10mM, para enriquecer la muestra en glóbulos blancos y lisar los glóbulos rojos. Se agitó suavemente por inversión durante 10', se centrifugó a máxima velocidad durante otros 10' y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el proceso hasta que el pellet de glóbulos blancos se viera limpio.

Se agregaron 4ml de solución de CTAB 2% (NaCl 1,4M, EDTA 20mM, Tris 100mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.2%, CTAB 2%) con el objeto de que el detergente rompa las membranas de los leucocitos y libere el ADN contenido en los mismos. Se agitó enérgicamente durante 10' y se incubó 1h a 60°C.

Para purificar el ADN, se realizaron 2 extracciones, cada una con 1 vol de IAC (cloroformo:isoamílico, 24:1 v/v) saturado en H<sub>2</sub>O, invirtiendo el tubo suavemente por 5' y centrifugando por otros 5'. Se recuperó el sobrenadante (fase acuosa) trasvasándola a un tubo limpio. La segunda extracción, similar a la primera, aumenta la pureza del ADN obtenido.

Por último, se precipitó el ADN de la fase acuosa con 1 vol de isopropanol o 2 vol de etanol 100% frío. Se recuperó el pellet obtenido con una varilla de vidrio o un tip estéril y se lo colocó en un eppendorf. Se dejó secar en estufa a 37°C y se resuspendió en 500 $\mu$ l de agua bidestilada estéril.

La determinación de la pureza, concentración e integridad del ADN purificado se realizó con una alícuota de cada uno de los ADN purificados que se diluyó en un volumen final de 1ml y se realizó un barrido de absorbancias en un espectrofotómetro en la región ultravioleta en el rango de longitudes de onda: 220 - 300nm. Teniendo en cuenta que el coeficiente de absorbancia a 260nm para ADN es 50 $\mu$ g/ml, se calculó la concentración de ADN en cada muestra.

La relación de absorbancias 260 / 280nm permitió determinar la pureza de las muestras en cuanto al contenido de proteínas.

La integridad del ADN se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE1X, usando como buffer de corrida TBE 1X pH 8,0, coloreados con bromuro de etidio (10mg/ml en agua) y se observó la fluorescencia producida en un transiluminador UV (BTS-20.S UVitec

Limited). Se usaron cubas horizontales estándar de la empresa Invitrogen utilizando una diferencia de potencial constante de 4 V/cm.

Buffer TBE10X:

Tris: 108gr

Acido Bórico: 55gr

EDTA 0,5M: 40ml

Agua c.s.p. 1000ml

La mezcla de siembra consistió en 5µl de ADN y 1µl de buffer de siembra 6X (glicerol en H<sub>2</sub>O 30% v/v, azul de bromofenol 0.25% p/v) obteniéndose un volumen final de 6µl.

Se amplificaron todas las regiones codificantes y las zonas adyacentes, y la región del promotor 2 del gen HNF4A, utilizando los kits comerciales “Go! Taq amplification kit” (Promega) o equivalentes. Todos los productos de amplificación fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, coloreados con bromuro de etidio (de la misma manera que para ADN), para chequear la presencia de banda única y la correcta amplificación en cuanto a tamaño, juntamente con un marcador de peso molecular adecuado.

La secuencia de los primers utilizados fue tomada de [43] y de [44], incluyendo la secuencia de los primers necesarios para la amplificación del exón 4. En ese caso no se podían lograr productos de la calidad requerida por lo cual se procedió a realizar un diseño propio de primers para la amplificación de esa región lo cual mejoró notablemente el rendimiento y la calidad del producto obtenido.

Para el diseño del juego de primers para amplificar el exón 4 se usaron las herramientas **Primer 3 plus** para el diseño y la corroboración de los parámetros de las secuencias y las indicaciones de la **página web de la Universidad de Wisconsin** para el estudio de la formación de uniones intra e inter catenarias, según:

<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>

[http://bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Seq\\_Anal/Primer\\_Design/primer\\_design.htm](http://bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Seq_Anal/Primer_Design/primer_design.htm)

Dado que del estudio de los parámetros no se obtenían los mejores índices posibles, procedimos a hacer un ajuste manual seleccionando un primer reverse corrido un nucleótido respecto de los sugeridos por Primer 3 plus dado que es deseable que los primers del lado en que se unirá la polimerasa tengan la unión al templado lo más fuerte posible.

En tal forma es preferible que tengan un extremo con al menos una citosina o una guanina ya que su unión al templado será de tres puentes de hidrógeno, respecto de los dos de la adenina o la timina.

Todos los exones fueron amplificados separadamente excepto el 1d que dada su proximidad con el promotor 2, se hicieron en conjunto.

La siguiente es la tabla de primers utilizados para las reacciones de amplificación:

	Primer Forward	Primer reverse	Tamaño
<b>PROMOTER A</b>	TCCCAGAACAAGGATCCAGAAG	GGGTGCTAATTACAACTGCTGG	322
<b>PROMOTER B</b>	AGTGCCCGTGAGTCATGATGCC	TCGCATTCTCCCTGCCTCCAC	373
<b>PROMOTER 2 +E1d</b>	CGCCTGTATGCAACTCC	CAAAGCTGACCGCAGTC	625
<b>EXON 1A</b>	GGGCACTGGGAGGAGGCAGT	GCCTGTAGGACCAACCTACC	340
<b>EXON 1C</b>	CACAGGTGTTGCCAAGTGAAGC	CACCGAGAAATGCGGTTATGTC	357
<b>EXON 1B</b>	TCTGGTGTGCACGACTGCAC	CTGGAGCTGCAGCCTCATAAC	325
<b>EXON 2</b>	AAGGCTCCCTTAGATGCCTG	CCACTCAGGGAGAAGACAGACCT	321
<b>EXON 3</b>	CCTAGTTCTGTCCCTAAGAGG	GTCATAAAGTGTGGCTACAG	253
<b>EXON 4 PROPIO</b>	CATCAGTCACAGACACCCCC	AGGTTCGATTCCCTGCCCTTG	365
<b>EXON 4</b>	CCACCCCTACTCCATCCCTGT	CCCTCCCGTCAGCTGCTCCA	270

<b>EXON 5</b>	TATCTCCAGCATTTTCTTCCC	CACTGCCCACTACTGCC	267
<b>EXON 6</b>	GCCCAGCGTCACTGAGTTGGCTA	TTGCCTGGGTGAGTGCCATG	234
<b>EXON 7</b>	GCACCAGCTATCTTGCCAAC	AGGAGAAGTCTGGCAGAGCG	315
<b>EXON 8</b>	TTGTTGAGGTCCCTGAATCCTT	ACAGATATCCACGCATCCATACA	
<b>EXON 9</b>	TGGTTGATTGGCCACGCCTG	ATCCTGGTTCTACCTTCTAG	341
<b>EXON 10</b>	CATTTACTCCCACAAAGGCT	GACCACGTGATCACCAGGTG	277

Tabla 5: tabla de primers usados en las reacciones de amplificación. Para el caso de la amplificación del exón 4 dado que el descrito en la bibliografía no funcionaba a adecuadamente se diseñó un primer propio.

Las condiciones finales de las PCR llevadas a cabo fueron las siguientes:

#### **Promotor P21d (promotor 2 + exón 1d)**

##### **Protocolo de amplificación:**

<b>ITEM</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Buffer 10X</b>	2.5 ul	1x
<b>PFyPR</b>	2 ul	0.08 uM de cada uno
<b>Enzima</b>	0.125 ul	0.625 U
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1.5 ul	3 mM
<b>dNTP</b>	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
<b>H2O</b>	Csp 25 ul	--
<b>ADN genómico</b>	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
<b>Volumen final</b>	25 ul	--

##### **Condiciones de ciclado:**

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:seg)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	4:00	-
Desnaturalización	95	0:15	
Annealing	62	0:30	X 40
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	
Conservación	15	10:00	-

## **EXON 2**

### **Protocolo de amplificación:**

ITEM	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5 ul	1x
PFyPR	2 ul	0.08 uM de cada uno
Enzima	0.125 ul	0.625 U
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5 ul	3 mM
dNTP	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
H2O	Csp 25 ul	--
ADN genómico	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
Volumen final	25 ul	--

### **Condiciones de ciclado:**

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:seg)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	4:00	-
Desnaturalización	95	0:15	X 40
Annealing	56	0:30	

Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	
Conservación	15	10:00	-

### **EXON 3**

#### **Protocolo amplificación:**

ITEM	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5 ul	1x
PFyPR	1 ul	0.04 uM de cada uno
Enzima	0.125 ul	0.625 U
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,3 ul	1.8 mM
dNTP	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
H2O	Csp 25 ul	--
ADN genómico	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
Volumen final	25 ul	--

#### **Condiciones de ciclado:**

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:seg)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	4:00	-
Desnaturalización	95	0:15	
Annealing	53	0:30	X 42
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	
Conservación	15	10:00	-

### **EXON 4**

**Condiciones de amplificación:**

ITEM	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5 ul	1x
PFyPR	2,5 ul	0.1 uM de cada uno
Enzima	0.125 ul	0.625 U
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,8 ul	3,3 mM
dNTP	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
H2O	Csp 25 ul	--
ADN genómico	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
Volumen final	25 ul	--

**Condiciones de ciclado:**

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min:seg)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	4:00	-
Desnaturalización	95	0:15	
Annealing	60	0:30	X 40
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	
Conservación	15	10:00	-

**EXON 5****Condiciones de amplificación:**

ITEM	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5 ul	1x
PFyPR	2 ul	0.08 uM de cada uno

<b>Enzima</b>	0.125 ul	0.625 U
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1,5 ul	3 mM
<b>dNTP</b>	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
<b>H2O</b>	Csp 25 ul	--
<b>ADN genómico</b>	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
<b>Volumen final</b>	25 ul	--

**Condiciones de ciclado:**

<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TIEMPO (min:seg)</b>	<b>CICLOS</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	4:00	-
<b>Desnaturalización</b>	95	0:15	
<b>Annealing</b>	56	0:30	X 38
<b>Extensión</b>	72	1:00	
<b>Extensión final</b>	72	5:00	
<b>Conservación</b>	15	10:00	-

**EXON 6**

**Condiciones de amplificación:**

<b>ITEM</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Buffer 10X</b>	2.5 ul	1x
<b>PFyPR</b>	2 ul	0.08 uM de cada uno
<b>Enzima</b>	0.125 ul	0.625 U
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1,5 ul	3 mM
<b>dNTP</b>	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
<b>H2O</b>	Csp 25 ul	--
<b>ADN genómico</b>	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul

<b>Volúmen final</b>	25 ul	--
----------------------	-------	----

**Condiciones de ciclado:**

<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA (OC)</b>	<b>TIEMPO (min:seg)</b>	<b>CICLOS</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	4:00	-
<b>Desnaturalización</b>	95	0:15	X 38
<b>Annealing</b>	56	0:30	
<b>Extensión</b>	72	1:00	
<b>Extensión final</b>	72	5:00	
<b>Conservación</b>	15	10:00	-

**EXON 7**

**Condiciones de amplificación:**

<b>ITEM</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Buffer 10X</b>	2.5 ul	1x
<b>PFyPR</b>	2 ul	0.08 uM de cada uno
<b>Enzima</b>	0.125 ul	0.625 U
<b>MgCl2 (25mM)</b>	1,5 ul	3 mM
<b>dNTP</b>	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
<b>H2O</b>	Csp 25 ul	--
<b>ADN genómico</b>	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
<b>Volumen final</b>	25 ul	--

**Condiciones de ciclado:**

PASO	TEMPERATURA (OC)	TIEMPO (min:seg)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	4:00	-
Desnaturalización	95	0:15	X38
Annealing	58	0:30	
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	
Conservación	15	10:00	-

### **EXON 8**

#### **Condiciones de amplificación:**

ITEM	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5 ul	1x
PFyPR	2 ul	0.08 uM de cada uno
Enzima	0.125 ul	0.625 U
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 ul	3 mM
dNTP	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
H <sub>2</sub> O	Csp 25 ul	--
ADN genómico	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
Volumen final	25 ul	--

#### **Condiciones de ciclado:**

PASO	TEMPERATURA (OC)	TIEMPO (min:seg)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	4:00	-
Desnaturalización	95	0:15	X 38
Annealing	57	0:30	

Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	
Conservación	15	10:00	-

## **EXON 9**

### **Condiciones de amplificación:**

ITEM	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5 ul	1x
PFyPR	2 ul	0.08 uM de cada uno
Enzima	0.125 ul	0.625 U
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 ul	3 mM
dNTP	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
H <sub>2</sub> O	Csp 25 ul	--
ADN genómico	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
Volumen final	25 ul	--

### **Condiciones de ciclado:**

PASO	TEMPERATURA (OC)	TIEMPO (min:seg)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	4:00	-
Desnaturalización	95	0:15	
Annealing	57	0:30	X38
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	
Conservación	15	10:00	-

## **EXON 10**

**Condiciones de amplificación:**

ITEM	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5 ul	1x
PFyPR	2 ul	0.08 uM de cada uno
Enzima	0.125 ul	0.625 U
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 ul	3 mM
dNTP	0.5 ul	0,2 mM de cada uno
H <sub>2</sub> O	Csp 25 ul	--
ADN genómico	Aprox. 200 ng	8 ng/ ul
Volúmen final	25 ul	--

**Condiciones de ciclado:**

PASO	TEMPERATURA (OC)	TIEMPO (min:seg)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	4:00	-
Desnaturalización	95	0:15	
Annealing	57	0:30	X 38
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	
Conservación	15	10:00	-

**3.e. Procesamiento y análisis de la información.**

La secuenciación de todos los productos de amplificación se realizó en el servicio de secuenciación que provee la empresa laboratorio Manlab (Buenos Aires, Argentina) y los

resultados fueron analizados en nuestro laboratorio por medio del software Chromas pro 2.1.8 (Technelysium Pty Ltd).

Los análisis bioinformáticos fueron realizados por medio de los servicios provistos por:

Pubmed: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Gene: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

OMIM: <https://www.omim.org/>

Mutation taster: <http://www.mutationtaster.org/>

HMGD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (OMIM, Pubmed, Gene, etc.)

BDGP: <https://www.fruitfly.org/index.html>

SIFT: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>

ClinVar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

## 4. Resultados.

En función de las técnicas desarrolladas se lograron diagnosticar como MODY1 a cuatro pacientes de veinticinco estudiados, identificando en total dos mutaciones diferentes y una tercera repetida en dos individuos no relacionados. Lo cual representa hasta nuestro conocimiento los primeros pacientes de este tipo diagnosticados en el país. Por otro lado, y hasta nuestro conocimiento las mutaciones encontradas son nuevas, no han sido reportadas en la bibliografía.

Las mutaciones encontradas fueron:

**1- Heterocigota para c.416C>T (T139I)**

**2- Heterocigota para c.420C>T (R140 >STOP)**

**3- Heterocigota para c.931-32\_960del62 (en dos pacientes no relacionados)**

Todas las mutaciones fueron analizadas por medio de todas las herramientas bioinformáticas necesarias según el caso, las cuales en forma uniforme indican que son patogénicas con diversos grados de certeza.

### 1- Heterocigota para c.416C>T (T139I)

Caracterización clínica inicial: MODY3

Resultado del estudio de mutaciones en el gen HNF1A: negativo

Se sospecha MODY1 y se incluye en la cohorte para estudiar mutaciones en el gen HNF4A.

Resultado del estudio del gen según referencias de la presente tesis: positivo

Heterocigota para c.418C>T / Arg>STOP / R140X

Búsqueda en la base de datos de mutaciones HMGD:

CM1310938	136	Diabetes, MODY	<a href="#">Flannick (2013) Nat Genet 45, 1380</a>
CM010325	141	Diabetes, MODY1	<a href="#">Aguilar-Salinas (2001) J Clin Endoc</a> Additional report available to <a href="#">subscribers</a>

No existen reportes de este tipo de mutaciones en esa posición.

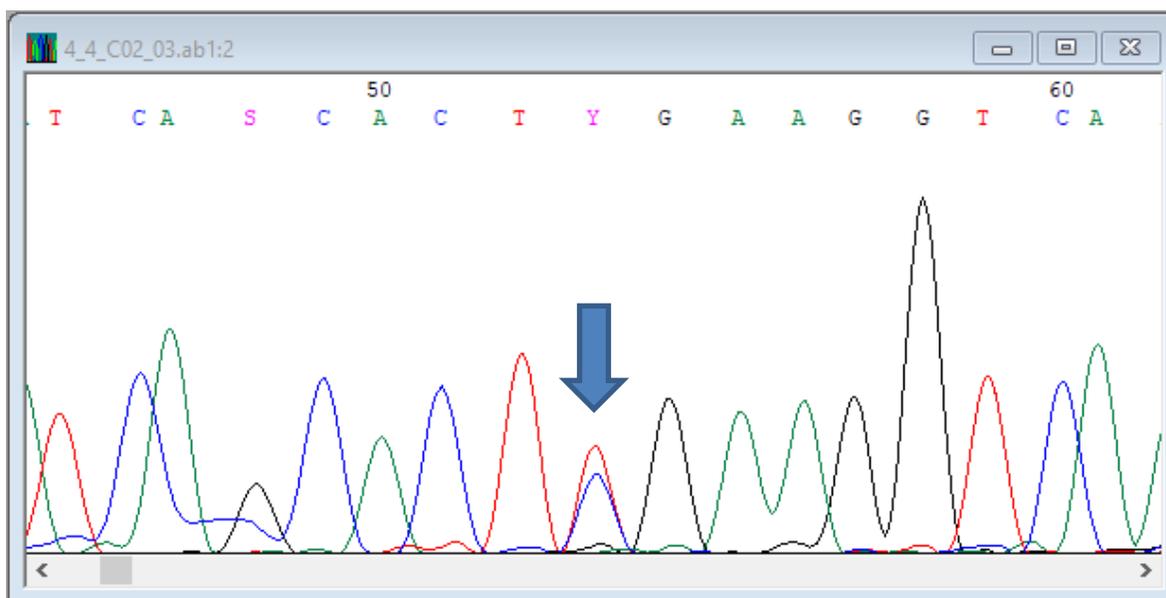
Reporte del informe de Mutation taster:

Probabilidad cercana a 1 de ser causante de la patología. Cambio de sentido de traducción con posibilidad de sintetizar una proteína no funcional.

Tabla de datos del paciente:

<i>Referencia paciente: M004</i>	
<i>edad a la consulta (años)</i>	21
<i>edad al diagnóstico (años)</i>	16
<i>IMC ()</i>	24,16
<i>antecedentes familiares</i>	si
<i>Glucosa en ayunas</i>	120
<i>Glucosa 120</i>	s/d
<i>A1c</i>	6,3
<i>Tratamiento</i>	Metformina

Secuencia del exón 4 del paciente, con la flecha mostrando la alteración encontrada:



Diagnóstico final: MODY1

## 2- Heterocigota para c.420C>T (R140 >STOP)

Caracterización clínica inicial: MODY3

Resultado del estudio de mutaciones en el gen HNF1A: negativo

Se sospecha MODY1 y se incluye en la cohorte para estudiar mutaciones en el gen HNF4A.

Resultado del estudio del gen según referencias de la presente tesis: positivo

Heterocigota para c.416 C>T / Tre139Ileu / I139L

Búsqueda en la base de datos de mutaciones HMGD:

CM1310938	136	Diabetes, MODY	<a href="#">Flannick (2013) Nat Genet 45, 1380</a>
CM010325	141	Diabetes, MODY1	<a href="#">Aguilar-Salinas (2001) J Clin Endoc</a> Additional report available to <a href="#">subscribers</a>

No existen reportes de este tipo de mutaciones en esa posición.

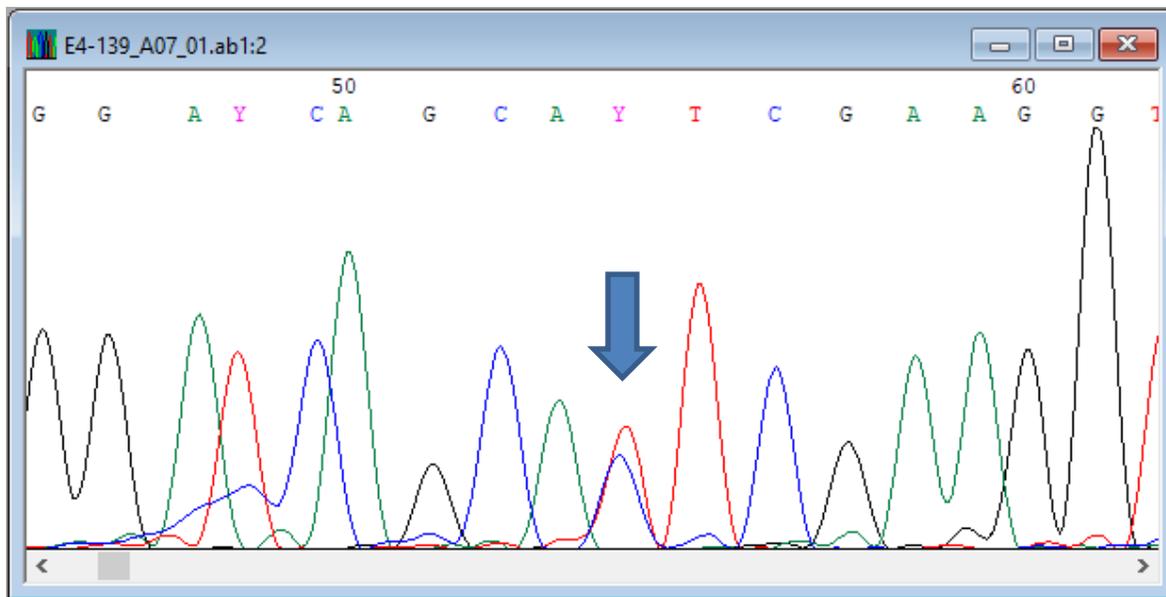
Reporte del informe de Mutation taster:

Probabilidad de 1 de ser causante de la patología. Generación de un sitio de STOP de traducción con posibilidad de sintetizar una proteína truncada no funcional.

Tabla de datos del paciente:

<i>Referencia paciente: M139</i>	
<i>edad a la consulta (años)</i>	36
<i>edad al diagnóstico (años)</i>	33
<i>IMC ()</i>	24.11
<i>antecedentes familiares</i>	antecedentes fam Si (padre y abuelo paterno)
<i>Glucosa en ayunas</i>	131
<i>Glucosa 120</i>	152
<i>A1c</i>	6.6
<i>Tratamiento</i>	MHD

Secuencia del exón 4 del paciente, con la flecha mostrando la alteración encontrada:



Diagnóstico final: MODY1

### 3-a- Heterocigota para c.931-32\_960del62 (en dos pacientes no relacionados)

Caracterización clínica inicial: MODY3

Resultado del estudio de mutaciones en el gen HNF1A: negativo

Se sospecha MODY1 y se incluye en la cohorte para estudiar mutaciones en el gen HNF4A.

Resultado del estudio del gen según referencias de la presente tesis: positivo

Heterocigota para la mutación c.931-32\_960del62

Búsqueda en la base de datos de mutaciones HMGD:

CD133298	258	Diabetes, MODY	<a href="#">Colclough (2013) Hum Mutat 34, 669</a>
CD108587	318	Diabetes, MODY	<a href="#">Carette (2010) Diabet Med 27, 1454</a>

No existen reportes de este tipo de mutaciones en esa posición.

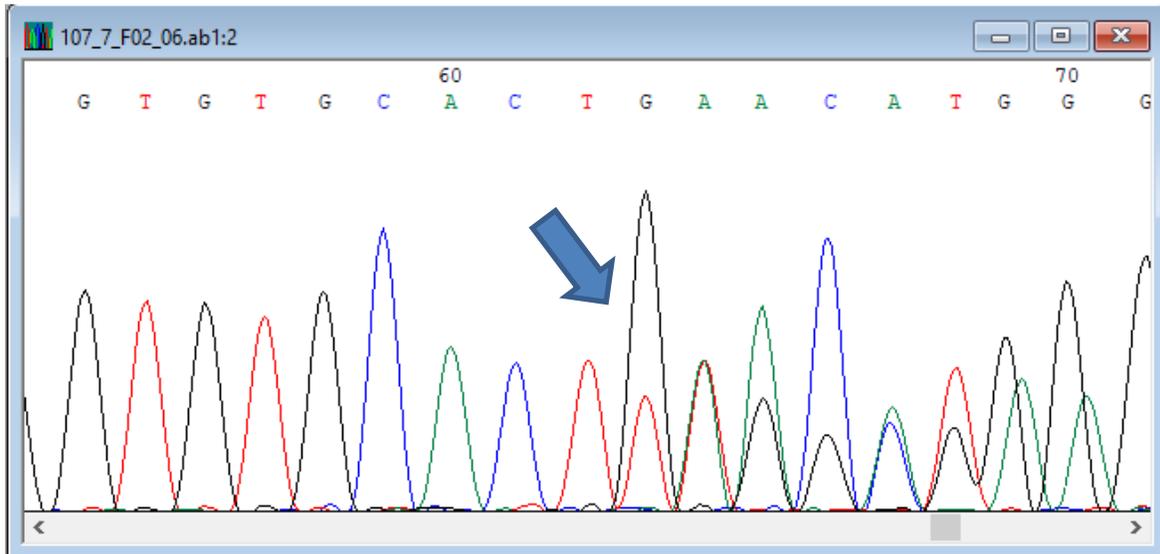
#### Reporte del informe de Mutation taster:

Probabilidad de 1 de ser causante de la patología. Generación de un sitio de STOP de traducción con posibilidad de sintetizar una proteína truncada no funcional.

#### Tabla de datos del paciente:

	<i>Referencia paciente: M107</i>
<i>edad a la consulta (años)</i>	31
<i>edad al diagnóstico (años)</i>	26
<i>IMC ()</i>	22
<i>antecedentes familiares</i>	no
<i>Glucosa en ayunas</i>	s/d
<i>Glucosa 120</i>	s/d
<i>A1c</i>	6,6
<i>Tratamiento</i>	Vildagliptina /Gliclazida

Secuencia del exón 7 del paciente, con la flecha mostrando la alteración encontrada:



En las siguientes figuras se puede apreciar el resultado de analizar el resultado posible de la deleción sobre el splicing en la región dadora del exón 7 que se ve involucrada. Se pierde completamente el sitio correcto de splicing y a pesar de que la estructura de la proteína resultante de ese alelo no se puede predecir, si podemos inferir que pierde por completo su funcionalidad dado el grave cambio conformacional que podría sufrir.

En la figura siguiente se puede ver el resultado del análisis de la secuencia normal de la región afectada mostrando el sitio normal de splicing, marcado con el recuadro:



En la figura siguiente el resultado del análisis con la herramienta BDGP (<http://www.fruitfly.org>) de la secuencia mutada con falta total del sitio de splicing correcto:

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 157.92.251.137.9747.0 :

Start	End	Score	Exon	Intron
162	156	0.52	gcccag	<b>g</b> ccagtg

---

Acceptor site predictions for 157.92.251.137.9747.0 :

Start	End	Score	Intron	Exon
167	147	0.44	gagctagtgctgccccttc	<b>g</b> gagctgagatcgatgacaa
148	180	0.30	ccatcctctctcttgacc	<b>g</b> ctacagtgacacccctctaa
212	251	0.34	atctctgactctctctctc	<b>g</b> awgctctgacagacttctc

Diagnóstico final: MODY1

### 3-b- Heterocigota para c.931-32\_960del62 (en dos pacientes no relacionados)

Caracterización clínica inicial: MODY3

Resultado del estudio de mutaciones en el gen HNF1A: negativo

Se sospecha MODY1 y se incluye en la cohorte para estudiar mutaciones en el gen HNF4A.

Resultado del estudio del gen según referencias de la presente tesis: positivo

Heterocigota para la mutación c.931-32\_960del62

Búsqueda en la base de datos de mutaciones HMGD:

CD133298	258	Diabetes, MODY	<a href="#">Colclough (2013) Hum Mutat 34, 669</a>
CD108587	318	Diabetes, MODY	<a href="#">Carette (2010) Diabet Med 27, 1454</a>

No existen reportes de este tipo de mutaciones en esa posición.

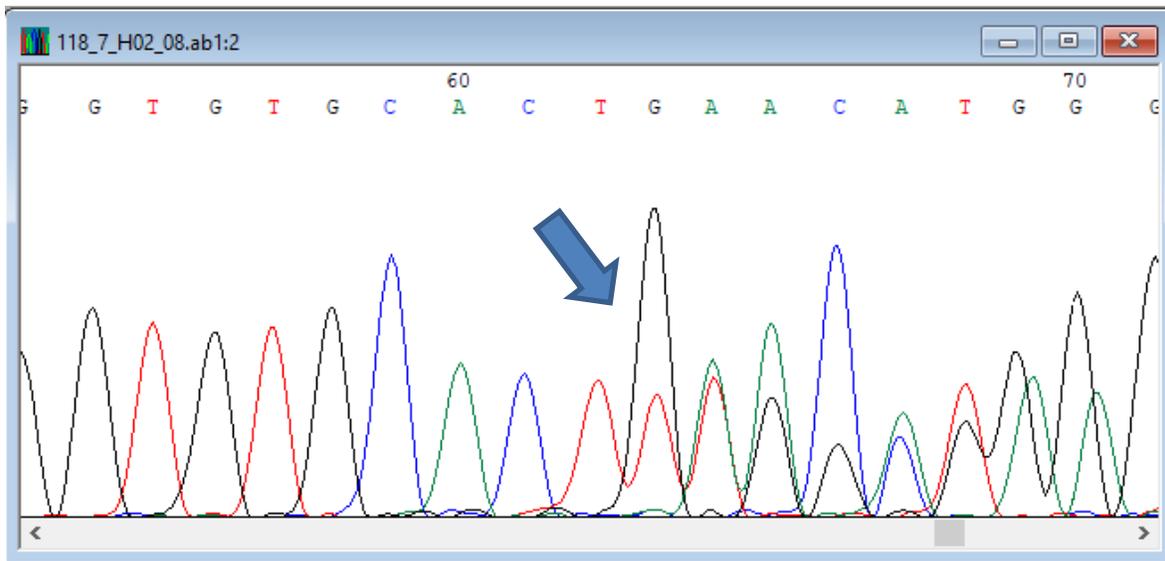
#### Reporte del informe de Mutation taster:

Probabilidad de 1 de ser causante de la patología. Generación de un sitio de STOP de traducción con posibilidad de sintetizar una proteína truncada no funcional.

Tabla de datos del paciente:

<i>Referencia paciente: M118</i>	
<i>edad a la consulta (años)</i>	38
<i>edad al diagnóstico (años)</i>	28
<i>IMC ( )</i>	26,97
<i>antecedentes familiares</i>	Si (ambos padres y tía materna)
<i>Glucosa en ayunas</i>	133
<i>Glucosa 120</i>	s/d
<i>A1c</i>	5,9
<i>Tratamiento</i>	MHD

Secuencia del exón 7 del paciente, con la flecha mostrando la alteración encontrada:



En la figura siguiente se puede ver el resultado del análisis de la secuencia normal de la región afectada mostrando el sitio normal de splicing, marcado con el recuadro:

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 157.92.251.137.9784.0 :

Start	End	Score	Exon	Intron
53	65	0.61	ccccag <b>g</b> gacttc	
244	258	0.32	gccllag <b>g</b> ccagtg	

---

Acceptor site predictions for 157.92.251.137.9784.0 :

Start	End	Score	Intron	Exon
74	124	0.50	ctccacccccacccttc <b>g</b> gaetgacacatgtact	
140	200	0.44	gagctggtgctgccttc <b>g</b> gagctgagctgatgacaa	
210	270	0.30	ccatcctctctttgaccc <b>g</b> gtacagtgacacctctaa	
275	313	0.34	catcttgactctctcttc <b>g</b> accgctctgacactcttc	

En la figura siguiente el resultado del análisis con la herramienta BDGP (<http://www.fruitfly.org>) de la secuencia mutada con falta total del sitio de splicing correcto:

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 157.92.251.137.9747.0 :

Start	End	Score	Exon	Intron
182	196	0.02	gccccag <b>g</b> ccagtg	

---

Acceptor site predictions for 157.92.251.137.9747.0 :

Start	End	Score	Intron	Exon
187	247	0.44	gagctggtgctgccttc <b>g</b> gagctgagctgatgacaa	
145	206	0.30	ccatcctctctttgaccc <b>g</b> gtacagtgacacctctaa	
213	251	0.30	catcttgactctctcttc <b>g</b> accgctctgacactcttc	

Diagnóstico final: MODY1

Por otro lado, hemos encontrado una variante que según el análisis predictivo produciría un cambio de aminoácido en la proteína pero que está descrita como un polimorfismo poblacional por lo cual no se puede asignar relación con el desarrollo de la patología. Dicha variante encontrada se denomina: c.292C>T (H98Y). Según las bases de datos consultadas corresponde un polimorfismo poblacional con cambio de aminoácido, pero de efecto neutro.

Sorprendentemente se han encontrado dos pacientes con la misma mutación (-3-) sin que sea de nuestro conocimiento o de los pacientes tener entre ellos una relación familiar.

Los estudios bioinformáticos aplicados mediante diversas herramientas avalan los supuestos efectos de las mutaciones encontradas, esto es, ser etiogénicas de diabetes tipo MODY1.

Este diagnóstico permitirá a los médicos actuantes orientar el tratamiento en estos pacientes de tal forma de tratarlos según su etiología específica lo cual redundará indudablemente en una mejor calidad de vida para ellos.

A la fecha estamos realizando la modificación del tratamiento en los pacientes que no eran tratados adecuadamente con el consentimiento del médico actuante.

Respecto a la estadística obtenida podemos decir que la frecuencia de pacientes que llegan a consulta y son catalogados como MODY3 y que al no tener mutaciones en el gen respectivo fueron estudiados para MODY1 y resultan positivos, llega al 16%. Del total de veinticinco pacientes caracterizados como MODY3 sin mutaciones en el gen HNF1A estudiados, cuatro presentaron mutaciones en el gen HNF4A MODY1. Esa población no representa el total de MODY1 respecto de todos los diabéticos de Argentina ya que la población fue seleccionada sobre los diabéticos caracterizados como MODY3 con genotipificación negativa.

Además, se han analizado por medios bioinformáticos, las variantes génicas encontradas en 19 pacientes genotipificados como MODY3 de 72 pacientes reclutados con características clínicas de MODY3 de un estudio anterior. Esos 19 han sido diagnosticados como diabéticos MODY3 a raíz del resultado de los estudios genéticos en conjunto con los resultados de los estudios de bioinformática, de los cuales se desprende que las variantes tienen una muy alta probabilidad de ser causales de la patología. Mientras que se ha podido determinar que existe un número de hallazgos genéticos que deben ser clasificados como polimorfismos o variantes de efecto desconocido por lo cual los portadores son excluidos del diagnóstico de MODY3.

Se han utilizado y comparado diversas herramientas dependiendo el tipo de variante encontrada, por lo cual se ha podido determinar las más útiles en cada caso y la mejor

manera de utilizarlas. En definitiva, hemos concluido que la mejor opción es la herramienta mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/>) para variantes en regiones codificantes o adyacentes y BDGP (<http://www.fruitfly.org>) para cambios en sitios de splicing o en promotores.

En una gran proporción de pacientes se han encontrado diversos polimorfismos ya descritos en la bibliografía como no deletéreos.

## **5. Discusión y conclusiones.**

La Diabetes es una enfermedad sumamente compleja en la cual confluyen muchos factores de diversa índole, como ser factores desencadenantes ambientales y factores predisponentes genéticos. Dependiendo del grado y de las características de los componentes involucrados, los enfermos desarrollan alguno de los distintos tipos de Diabetes.

Si bien existen caracterizaciones clínicas para cada tipo de Diabetes conocida, no siempre solo con los estudios observacionales y clínicos se puede llegar a un diagnóstico final certero. Existe una enorme variabilidad entre individuos dada por la heterogénea etiología que está asociada al desarrollo de alguno de los tipos de Diabetes.

En el caso específico de los diabéticos tipo MODY, el factor predominante es el genético, pero sin embargo existe una variabilidad entre ellos no solo dada por que se encuentran alteraciones en distintos genes, sino porque las mutaciones pueden ser de diverso tipo y localización dentro del gen afectado, lo cual hace que las presentaciones clínicas varíen a veces sustancialmente incluso dentro del mismo subtipo.

En el caso del presente estudio el problema se ve amplificado dada la superposición de la actividad de las proteínas codificadas por dos genes distintos pero cuyos productos tienen similar injerencia sobre la actividad del gen de la insulina.

Esta superposición de la actividad de ambos factores de transcripción hace mucho más complejo de por sí el estudio y una caracterización clínica de estos pacientes que le permita al médico actuante llegar a un diagnóstico final preciso y a tiempo.

De tal forma el uso de herramientas de biología molecular se hace imprescindible en estos casos porque es la forma en que la caracterización del tipo de Diabetes se puede precisar en forma concluyente en estos individuos.

Incluso es imperativo hacer la caracterización molecular, dado que ya se cuenta con experiencia suficiente para poder prever que estos pacientes deben ser tratados de forma particular y no recibir tratamientos inadecuados que llevan a un deterioro en su calidad de vida y pronóstico a largo plazo.

En el caso del presente trabajo se ha producido un aporte al conocimiento de las frecuencias del subtipo de Diabetes MODY1 en nuestro país, lo cual no había sido reportado previamente.

Se han puesto a punto las metodologías y parámetros de las reacciones necesarias para los estudios moleculares, todo lo cual será transferido a los laboratorios de análisis clínicos de alta complejidad para que incorporen de rutina el diagnóstico de este tipo de Diabetes.

Se ha logrado establecer que dada la frecuencia de aparición del MODY1 entre los pacientes clínicamente caracterizados como MODY3 pero con diagnóstico negativo, es altamente recomendable hacer a posteriori el estudio de mutaciones en el gen HNF4A para tratar de identificar la posible mutación presente en un individuo afectado con las características clínicas coincidentes.

En los casos en los cuales hemos encontrado mutaciones, estas han sido comunicadas a los médicos intervinientes y en caso que los pacientes no tuvieran un tratamiento adecuado se los ha instruido de cambiarlo ya que esto conlleva un beneficio inmediato al paciente.

En el caso de los pacientes MODY3 estudiados por nuestro grupo previamente, el cambio de terapia ha sido sumamente fructífero por lo cual esperamos que en estos casos resulte de igual manera.

Según cada familia también se les sugiere a los médicos que soliciten los estudios a los familiares enfermos de los pacientes genotipificados, e incluso a los fenotípicamente sanos ya que es de suma importancia analizar a todos los individuos, dado el carácter hereditario de estas formas de Diabetes. Así se logra diagnosticar a familiares incluso antes que desarrollen los síntomas típicos, hacer un seguimiento de la segregación familiar de la

mutación y llegado el caso verificar que sea una mutación *de novo* en los casos que la patología se presenta sin antecedentes familiares.

Uno de los pacientes que presentaron la delección es un caso sin antecedentes familiares conocidos de Diabetes por lo cual se trataría de un caso de mutación *de novo*. En este caso correspondería el análisis de filiación de los padres y el paciente para corroborar el lazo parental y definir el caso como mutación *de novo*. Al respecto queda fuera del alcance del presente proyecto sin embargo luego de la comunicación a los familiares correspondería hacer ese estudio.

Esto aporta un importante dato que debe ser tenido en cuenta al estudio de estas alteraciones en los genes responsables de MODY, dado que, según nuestra experiencia en este y otros subtipos, la prevalencia de este tipo de casos es mucho mayor que la reportada en la bibliografía. Estos resultados deberán ser tenidos en cuenta para revisar los parámetros de diagnóstico recomendados internacionalmente al respecto de solo estudiar pacientes con antecedentes familiares.

Con respecto al análisis bioinformático se ha demostrado que provee un aporte de datos fundamentales para el estudio del efecto real de mutaciones en estos genes, los cuales no pueden ser analizados en forma sencilla con otras herramientas distintas de las bioinformáticas.

En este aspecto hemos establecido un método de análisis para trabajar una vez realizados los estudios moleculares. Así poder proceder de la misma forma para cada variante nueva que se encuentre y poder caracterizarla como polimorfismo o mutación causal y llegado el caso como variante de efecto neutro, lo cual es muy importante para no malinterpretar los hallazgos. Esas últimas variantes si bien son cambios en la secuencia nucleotídica no son causales de patología por lo cual deben ser correctamente caracterizadas con todas las herramientas e información disponible en bases de datos.

En definitiva, se han diagnosticado cuatro pacientes nuevos como MODY1 que fueron derivados inicialmente como MODY3 según sus características. Este diagnóstico se ha

podido realizar por el desarrollo y puesta a punto de las metodologías tanto de laboratorio como de informática realizados por el aporte del presente subsidio.

Estos pacientes y sus familiares afectados cuentan con un diagnóstico certero y tienen la posibilidad de recibir el mejor tratamiento disponible.

## 6. Bibliografía.

- [1] Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes. Resumen de orientación. Abril de 2016. American Diabetes Association -Diabetes Care 2014 Jan; 37(Supplement 1): S81-S90
- [2] American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2010: S62-S69.
- [3] Inzucchi ES. Diagnosis of diabetes. N Engl J Med 2012; 367: 542-50.
- [4] Sociedad Argentina de Diabetes. Consenso sobre criterio diagnóstico de la Glucemia Alterada en Ayunas. Consenso. En: <http://www.diabetes.org.ar/docs/Consenso.pdf>.
- [5] Matschinsky FM. Glucokinase, glucose homeostasis, and diabetes mellitus. CurrDiab Rep 5:171–176, 2005.
- [6] M.R. Slimel, F.E. Coppolillo, J.D. Masi, S.M. Mendoza, J. Tannuri. Epidemiología de la diabetes en Argentina. Ac Diabetol 2010;26:101-6 - DOI: 10.1016/S1134-3230(10)62006-6
- [7] Haines L, Wan KC, Lynn R, Barrett TG, Shield JP. Rising incidence of type 2 diabetes in children in the U.K. Diabetes Care. 2007 May 30(5): 1097-101. Epub 2007 Jan 26.
- [8] Rosenbloom A, Jol J, Young R, et al. Emerging epidemic of Type-2 diabetes in youth. Diabetes Care 22: 867–71, 2001.
- [9] Velho G, Froguel P. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. Eur J Endocrinol 138: 233-239, 1998.
- [10] Hattersley AT. Maturity Onset Diabetes of the Young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. Diabetic Med 15: 15-24, 1998.
- [11] Fajans SS1, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. N Engl J Med. 2001 Sep 27;345(13):971-80.
- [12] McDonald TJ, et al. Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes. Diabet Med; 28:1028–1033, 2011.
- [13] MIM #606391; MATURITY ONSET DIABETES OF THE YOUNG; MODY; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/606391>

- [14] Byrne MM, Sturis J, Clement K, et al. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J Clin Invest.*;93(3):1120–1130, 1994.
- [15] Pihoker C, et al. SEARCH for Diabetes in Youth Study Group. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:4055–4062.
- [16] Gardner D et al. Clinical features and treatment of maturity onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*: 5 101–108, 2012.
- [17] Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT. [European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)] Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. MODY group. *Diabetología* Apr 51(4): 546-53, 2008.
- [18] Frayling TM, et al. Beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 50(Suppl 1):S94–S100, 2001.
- [19] Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4a regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13209-14.
- [20] Klupa T, Warram J, Matonellis A et al. Determinants of the development of Diabetes (MODY 3) in carriers of HNF 1 alfa. *Diabetes Care* 25: 2292-2301, 2002.
- [21] Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Hepatocyte nuclear factor 4a regulates the expression of pancreatic b-cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 2000;275:35953-9.
- [22] Hansen SK, Parrizas M, Jensen ML, Pruhova S, Ek J, Boj SF, Johansen A, Maestro MA, Rivera F, Eiberg H, Andel M, Lebl J, Pedersen O, Ferrer J, Hansen T: Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function. *J Clin Invest* 110:827– 833, 2002
- [23] Eeckhoute J, Moerman E, Bouckenooghe T, Lukoviak B, Pattou F, Formstecher P, Kerr-Conte J, Vandewalle B, Laine B: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger

transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology* 144:1686 – 1694, 2003

[24] Markus Stoffel and Stephen A. Duncan. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 $\alpha$  regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *PNAS* November 25, 1997. 94 (24) 13209-13214; <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13209> Edited by James E. Darnell, Jr., The Rockefeller University, New York, NY, and approved September 15, 1997 (received for review July 9, 1997)

[25] Lorna W, Harries J, Locke B, Neil A, Hanley K, Steele A, et al. The Diabetic Phenotype in HNF4A Mutation Carriers Is Moderated By the Expression of HNF4 $\alpha$  Isoforms From the P1 Promoter During Fetal Development. *Diabetes*. 2008;57:1745-52.

[26] Ellard S, Thomas K, Edghill EL et al. Partial and whole gene deletion mutations of the GCK and HNF1A genes in maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 50: 2313–2317, 2007.

[27] Estalellal, et al. Mutations in GCK and HNF-1 $\alpha$  explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:538–546, 2007.

[28] Gragnoli C, Cockburn BN, Chiamonte F et al. Early Onset Type II Diabetes Mellitus in Italian families due to mutations in the genes encoding hepatic nuclear factor 1  $\alpha$  and glucokinase. *Diabetologia* Oct 44(10): 1326-1329, 2001.

[29] Costa A, Velho G, Froguel P et al. Genetic and Clinical characterization of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families. *European Journal of Endocrinology* 142: 380-386, 2000. 17(5): 637-641, 2004.

[30] Thomson KL, Gloyn AL, Colclough K et al. Identification of 21 novel glucokinase (GCK) mutations in UK and European Caucasians with Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY). *Hum Mutat* Nov 22(5): 417, 2003.

[31] Lindner TH, Cockburn BN, Bell GI. Molecular Genetics of MODY in Germany. *Diabetologia* 42:121-123, 1999.

- [32] Gill-Carey O, Shields B, Colclough K et al. Finding a glucokinase mutation alters patient treatment. *Diabet Med* 24 (Suppl 1): 6, 2007.
- [33] Chèvre JC, Hani EH, Stoffers DA, Habener JF, Froguel P. Insulin promoter factor 1 gene is not a major cause of maturity-onset diabetes of the young in French Caucasians. *Diabetes*. 1998 May;47(5):843-4
- [34] Mantovani V, Salardi S, Cerreta V, Bastia D, Cenci M, Ragni L, Zucchini S, Parente R, Cicognani A. Identification of eight novel glucokinase mutations in Italian children with maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat*. 2003 Oct 22(4): 338.
- [35] Toaima D, Näke A, Wendenburg J et al. Identification of novel GCK and HNF1A/TCF1 mutations and polymorphisms in German families with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat* 25(5):503-4, 2005.
- [36] E. R. Pearson. S. Pruhova. C. J. Tack. A. Johansen. H. A. J. Castleden. P. J. Lumb. A. S. Wierzbicki. P. M. Clark. J. Lebl. O. Pedersen. S. Ellard. T. Hansen. A. T. Hattersley. Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  mutations in a large European collection. *Diabetologia* (2005) 48: 878–885.
- [37] Barrio R, Bellane Chantelot C, Moreno JC et al. Nine novel mutations in Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) candidate genes in 22 Spanish families. *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2532-2539, 2002.
- [38] Gustavo Daniel Frechtel, Ariel Pablo López, Martín Rodríguez, Gloria Edith Cerrone, Héctor Manuel Targovnik. A novel mutation in Exon 5 of the Glucokinase gene in an Argentine MODY Family. *Molecular Diagnosis*; 7(2) 129-131, 2003.
- [39] AP Lopez, SA Foscaldi, MS Pérez, G Krochik, M Rodríguez, M Traversa, FM Puchulu, V Hirschler, I Bergada and GD Frechtel. Glucokinase gene mutation screening in Argentinean clinically characterized MODY patients. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, Vol 117(8): 391-4, 2009 Sep; Epub 2009 Apr 8.
- [40] Lopez AP, Foscaldi SA, Perez MS, Rodriguez M, Traversa M, Puchulu FM, Bergada I, Frechtel GD. HNF1 alpha gene coding regions mutations screening, in a Caucasian

population clinically characterized as MODY from Argentina. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Dec 16.

[41] 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* 27:854–869, 2006.

[42] Doss C, Priya George, Chiranjib Chakraborty, SA Syed Haneef, Nagarajan NagaSundaram, Luonan Chen, Hailong Zhu. Evolution- and Structure-Based Computational Strategy Reveals the Impact of Deleterious Missense Mutations on MODY 2 (Maturity-Onset Diabetes of the Young, Type 2). *Theranostics* 2014; 4(4):366-385. doi: 10.7150/thno.7473.

[43] Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, Lindgren C, Lipsanen-Nyman M, Weng J, Wibell L, Widén E, Tuomi T, Groop L. High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes.

[44] Taghavi SM, Fatemi SS, Rafatpanah H, Ganjali R, Tavakolafshari J, Valizadeh N. Mutations in the coding regions of the hepatocyte nuclear factor 4 alpha in Iranian families with maturity onset diabetes of the young.

## 7. Anexos.

### 7.1. Publicaciones y presentaciones derivadas.

[1] Identificación genético molecular de pacientes con características clínicas de MODY. Alejandro de Dios, Gloria Edith Cerrone, Sofía Trobo, María Cecilia Kiernicki, María Silvia Perez, Ignacio Chiesa, Gustavo Daniel Frechtel, Ariel Pablo López. XX Congreso Argentino de Diabetes, 9, 10 y 11 de noviembre de 2016. CABA, Argentina.

[2] MODY type Diabetes as an example of the application of the fundamentals of Translational Medicine. de Dios, Alejandro, Cerrone, Gloria Edith, Trobo, Sofía Irene, Kiernicki, María Cecilia, Perez, María Silvia, Chiesa, Ignacio, Frechtel, Gustavo Daniel, López, Ariel Pablo. III INTERNATIONAL CONGRESS OF TRASLATIONAL MEDICINE, Facultad de Farmacia y Bioquímica y Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. 21 y 22 de noviembre de 2016.

[3] MODY type Diabetes: results of a large study in Diabetes patients from Argentina. Alejandro de Dios, Sofia Irene Trobo, María Cecilia Kiernicki, María Silvia Pérez, Ignacio Chiesa, Gustavo Daniel Frechtel, Ariel Pablo Lopez. Reunión Anual Conjunta de Sociedades de Biociencias, SAIC, SAI, SAFE, 13 al 17 de noviembre de 2017, Buenos Aires Argentina.

[4] Búsqueda y análisis bioinformático de mutaciones en el gen HNF4A en pacientes con características clínicas de MODY3. María Cecilia Kiernicki; Alejandro de Dios; María Silvia Perez; Gustavo Daniel Frechtel; Ariel Pablo López. XXI Congreso Argentino de Diabetes 2018, 24-26 de octubre de 2018, Mar del Plata, Argentina.

[5] Identificación genético molecular de pacientes con características clínicas de MODY. De Dios Alejandro, Cerrone Gloria, Pérez María Silvia, Trobo Sofía Irene, Frechtel Gustavo, López Ariel Pablo. XXI Congreso Argentino de Diabetes 2018, 24-26 de octubre de 2018, Mar del Plata, Argentina.

[6] Búsqueda y análisis bioinformático de mutaciones en el gen HNF4A en pacientes con características clínicas de MODY3. XX JORNADA CIENTIFICA, organizada por la Secretaria de Ciencia y Tecnología, en el Instituto Universitario de Ciencias de la Salud Fundación H. A. Barceló, 7 de diciembre 2018. CABA, Argentina.

[7] Update of the results of the study of 4 different genes, in patients with clinical characterization of MODY type Diabetes.

Alejandro De Dios, María Cecilia Kiernicki, Martina Cerrato García, María Silvia Pérez, Gustavo Daniel Frechtel, Ariel Pablo López.

## 7.2. Informe económico y comprobantes de compra.

Planilla de gastos realizados:

Fecha	Nro Factura	Monto	Item	Empresa
28/4/2017	23791	\$ 564,40	Primers HNF4a	IDT
3/7/2017	27876	\$ 3.835,30	Secuencias	Manlab
1/8/2017	28305	\$ 2.513,94	Secuencias	Manlab
2/5/2017	27034	\$ 5.395,84	Secuencias	Manlab
2/10/2017	29018	\$ 18.000,00	Secuencias	Manlab
2/11/2017	29587	\$ 3.541,02	Secuencias	Manlab
30/11/2017	25839	\$ 2.337,77	Material plástico	Biodynamics
1/12/2017	30014	\$ 8.384,92	Sec y CdeH	Manlab
1/2/2018	30928	\$ 4.672,93	CdeH	Manlab
		\$ 49.246,12		

Monto solicitado y otorgado: **\$50,000.00** (pesos cincuenta mil con cero centavos)

Gastos totales: **\$49,246.12** (pesos cuarenta y nueve mil doscientos cuarenta y seis con doce centavos)

Saldo no utilizado retenido por Barcelo: **\$753.88** (pesos setecientos cincuenta y tres con ochenta y ocho centavos)