

**DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *HNF1A* EN UNA POBLACIÓN DE
PACIENTES CON SOSPECHA DIAGNÓSTICA DE *DIABETES MELLITUS* TIPO
MODY EN SANTANDER (COLOMBIA)**

MISAELEONARDO LÓPEZ CEPEDA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAGÍSTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2018**

DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *HNF1A* EN UNA POBLACIÓN DE
PACIENTES CON SOSPECHA DIAGNÓSTICA DE DIABETES MELLITUS TIPO
MODY EN SANTANDER (COLOMBIA)

MISAELEONARDO LÓPEZ CEPEDA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER EN
CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR

GUSTAVO ADOLFO CONTRERAS GARCÍA
MÉDICO ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA Y BIOÉTICA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
BUCARAMANGA

2018

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo gran apoyo prestado durante este tiempo de espera. A todas las personas de la UIS y compañeros de maestría, y amigos que adicional a sus conocimientos, son profesionales cuya colaboración recibí en momentos cruciales de mi vida académica. A la doctora Adriana Castillo por sus agudas observaciones, las cuales tomo en cuenta con agradecimiento, así como por impulsarme a llegar más lejos y así mismo el LGH por permitirme la realización de este trabajo.

Finalmente al fondo de becas de Apoyo Económico a Estudiantes de Maestría de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la UIS y Colciencias por la financiación de este proyecto. Y al director de este proyecto de tesis, cuyos conocimientos no son tema de discusión, y fue el poseedor de la idea original para su realización.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN.....	16
1. OBJETIVOS.....	21
1.1. Objetivo general.....	21
1.2. Objetivos específicos.....	21
2. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES.....	22
2.1. Generalidades de la <i>diabetes mellitus</i> (DM).....	22
2.2. Funcionamiento de las células beta-pancreáticas.....	23
2.3. Diabetes monogénicas.....	24
2.4. <i>Diabetes mellitus</i> tipo MODY.....	26
2.5. Estudios de <i>diabetes mellitus</i> tipo MODY en latinoamerica.....	36
3. MATERIALES Y METODOS.....	38
3.1. Población de estudio.....	38
3.2. Metodología de análisis.....	40
4. RESULTADOS.....	53
5. DISCUSIÓN.....	67
6. CONCLUSIONES.....	73
7. RECOMENDACIONES.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS.....	87

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de primers utilizados en el estudio.	42
Tabla 2. Nomenclatura IUPAC.....	43
Tabla 3. Criterios de clasificación de patogenicidad BPGM.....	52
Tabla 4. Características clínicas de la DM1, DM2 y la DM tipo MODY.....	54
Tabla 5. Localización de las variantes identificadas	56
Tabla 6. Variantes no sinónimas que causan cambios de sentido.....	57
Tabla 7. Frecuencia de las variantes en bases de datos	58
Tabla 8. Clasificación de patogenicidad y análisis de conservación	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedencia por departamento.....	40
Figura 2. Gel del exón 2 con algunas muestras en el transiluminador.....	46
Figura 3. Gel del exón 3 con algunas muestras en el transiluminador.....	46
Figura 4. Gel del exón 4 con algunas muestras en el transiluminador.....	47
Figura 5. Gel del exón 5 con algunas muestras en el transiluminador.....	47
Figura 6. Gel del exón 6 con algunas muestras en el transiluminador.....	48
Figura 7. Gel del exón 7 con algunas muestras en el transiluminador.....	48
Figura 8. Gel del exón 5, evidencia de amplificación inespecífica.	49
Figura 9. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.864	59
Figura 10. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.1375	60
Figura 11. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.1460	62
Figura 12. Análisis de conservación del cambio p.(Ser487Asn).	62
Figura 13. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.481	64
Figura 14. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.475	66

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: CONSENTIMIENTO INFORMADO	87
ANEXO B: ASENTIMIENTO INFORMADO	94
ANEXO C: FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	95
ANEXO D: CARTA AUTORIZACIÓN USO DE MUETRAS PROYECTO ANIDADO	100
ANEXO E: CARTA AUTORIZACIÓN USO DE INFORMACIÓN PROYECTO ANIDADO	101

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
ABCC8	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8 Dispositivo de unión a ATP; 8 miembro subfamilia C
ACMG	American College of medical genetics Colegio Americano de Genética Médica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APPL1	Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH Domain, and leucine zipper-containing 1 Primera proteína adaptadora de interacción fosfotirosin, dominio PH y con cremallera de leucina
ARN	Ácido Ribonucleico
BLK	BLK Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase Proto-oncogén de la B Linfoide Tirosin-Quinasa
BPGM	Best Practice Guidelines for the Molecular & Genetic diagnosis of Maturity onset diabetes of the young Guía de Buenas Prácticas para el diagnóstico Genético-Molecular de la Diabetes Tardía de Inicio Juvenil
CEL	Carboxyl Ester Lipase Carboxil-ester lipasa
COLCIENCIAS	Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia
CRP	C-Reactive Protein
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism database
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM MODY	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo MODY
DMM	<i>Diabetes Mellitus</i> Mitocondrial
DMN	<i>Diabetes Mellitus</i> Neonatal

DM1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i> Consortio de agregación del exoma
GCK	Glucokinase Glucoquinasa
GGT	γ (Gamma) glutamyl transferase Glutamil-transferasa γ (Gamma)
HbA1c	Hemoglobina glicosilada A1c
HDL	High-density lipoprotein Lipoproteína de alta densidad
HGMD	Human Gene Mutation Database Base de datos de mutaciones del gen humano
HNF1A	Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha Primer factor Nuclear α del hepatocito
HNF1 β	Hepatocyte Nuclear Factor 1 Beta Primer factor Nuclear β del hepatocito
HNF4 α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Cuarto factor nuclear α del hepatocito
INS	Insulin Insulina
KCNJ11	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 11 Subunidad KIR6.2 del hetero-octámero K-ATP
KLF11	Kruppel Like Factor 11 Onceavo factor tipo Kruppel
LDL	low-density lipoprotein (LDL) lipoproteína de baja densidad
LOVD	Leiden Open Variation Database Base de datos abierta de variación de Leiden

mARN	ARN mensajero
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young Diabetes Tardía de Inicio Juvenil
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEUROD1	Neurogenic Differentiation 1 Primer diferenciador neurogénico
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute Instituto Nacional del Corazón, el Pulmón y la Sangre
NHLBI-ESP	National Heart, Lung, and Blood Institute-Exome Sequencing Project Proyecto de Secuenciación del Exoma del Instituto Nacional del Corazón, el Pulmón y la Sangre
NMC	<i>Nevo Melanocítico Congénito</i>
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa
ORF	Open Reading Frame Marco Abierto de Lectura
PAX4	Paired Box 4 Cuarto Dominio Pareado
PCR	Polymerase Chain Reaction Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDX1	Pancreatic And Duodenal Homeobox 1 Primer Homeobox Pancreático y duodenal
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
VLDL	Very Low Density Lipoprotein Lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN

TITULO: DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *HNF1A* EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES CON SOSPECHA DIAGNÓSTICA DE DIABETES MELLITUS TIPO MODY EN SANTANDER (COLOMBIA)*.

AUTOR: MISAEL LEONARDO LÓPEZ CEPEDA**.

PALABRAS CLAVE: *DIABETES MELLITUS* TIPO MODY, DIAGNÓSTICO GENÉTICO, HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE, NO INSULINODEPENDIENTE, DIABETES TARDÍA DE INICIO JUVENIL, INICIO TEMPRANO.

DESCRIPCIÓN:

La Diabetes Mellitus (DM) tipo MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) es la forma monogénica de DM más común afectando entre un 1 y 3% de pacientes, con una prevalencia 1/10000, hace referencia a un tipo de diabetes que se presenta en individuos jóvenes, usualmente menores de 25 años y se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina que puede ser moderado a severo. Se han descrito 14 genes asociados, siendo los más frecuentes GCK y HNF1A. Para establecer el diagnóstico correcto es necesario determinar la alteración molecular. En este trabajo se analizaron los exones 2 al 7 de HNF1A en una población con DM de inicio juvenil proveniente del oriente de Colombia. Se genotipificaron 104 individuos con diagnóstico de DM entre los 2 y 30 años de edad mediante secuenciación Sanger. Se identificaron 5 variantes previamente reportadas. La variante c.475C>T es la primera mutación causante de DM MODY reportada en población colombiana, aparece en un paciente no insulín dependiente, con glucosuria, nivel moderado de HbA1c, negatividad para auto-anticuerpos y peso normal. Se recomienda aumentar la población de estudio, así como secuenciar el resto del gen e incluir otros genes prevalentes como GCK. Se espera que estos resultados contribuyan al conocimiento de la DM tipo MODY en la región.

* Trabajo de investigación.

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Departamento de Ciencias Básicas. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Gustavo Adolfo Contreras García, médico especialista en Genética Médica y Bioética.

ABSTRACT

TITLE: MUTATION DETECTION IN THE *HNF1A* GENE IN PATIENTS WITH SUSPECTED MATURITY-ONSET DIABETES OF THE YOUNG (MODY) IN SANTANDER COLOMBIA*.

AUTHOR: MISAEL LEONARDO LÓPEZ CEPEDA**.

KEYWORDS: MODY TYPE *DIABETES MELLITUS*, GENETIC DIAGNOSIS, AUTOSOMIC DOMINANT INHERITANCE, NON-INSULINDEPENDENT, MATURITY ONSET DIABETES OF THE YOUNG, EARLY-ONSET.

DESCRIPTION:

Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) is the most common monogenic form of *diabetes mellitus* DM affecting between 1 and 3% of patients, with a prevalence of 1/10000. This type of DM occurs in young individuals (usually under 25 years old) and is characterized by a defect in insulin secretion that can be moderate to severe. Fourteen genes have been described associated with MODY, the most frequent being *GCK* and *HNF1A*. To establish the correct diagnosis it is necessary to determine the molecular alteration. In this study we sampled exons 2 to 7 of *HNF1A* gene in a population with DM of young onset from a eastern Colombia population. 104 individuals with a DM diagnosis at age 2-30 years were genotyped using Sanger sequencing. Five variant previously reported were identified. The variant c.475C> T is the first MODY mutation reported in a Colombian population. Affected subject was a non-insulin dependent patient, with glucosuria, moderate level of HbA1c, negativity for islet antibodies and normal weight. It is recommended to increase the population under study, as well as to sequence the rest of the gene and include other prevalent genes such as *GCK*. It is expected that these results contribute to the knowledge of MODY in the region.

* Research Work.

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Departamento de Ciencias Básicas. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Gustavo Adolfo Contreras García, médico especialista en Genética Médica y Bioética.

INTRODUCCIÓN

La *Diabetes Mellitus* (DM) agrupa un conjunto de enfermedades metabólicas cuya principal manifestación clínica es la hiperglucemia (niveles elevados de azúcar en sangre). En la ausencia de tratamiento oportuno la DM puede avanzar a un coma o la muerte. Los pacientes con DM se exponen a complicaciones que afectan su calidad de vida, dentro de las cuales se encuentran la pérdida de la visión, amputaciones, falla renal, neuropatía del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y falla coronaria¹. La prevalencia de DM ha venido en aumento (en especial en países en vías de desarrollo) debido al cambio en los estilos de vida y la cifra mundial de afectados se estima superior a los 442 millones de personas².

Las causas naturales de la DM no se limitan al desarrollo de resistencia a la insulina o la pérdida de células beta-pancreáticas por ataque celular auto-inmune. Las células beta pancreáticas pueden sufrir alteraciones hereditarias que les impiden llevar a cabo una correcta señalización, crecimiento y transcripción de insulina³. Esto se observa en las DM monogénicas en las cuales dichas alteraciones ocurren en un único gen. Las DM monogénicas incluyen la DM mitocondrial, la DM neonatal, y la DM tardía de inicio juvenil, mejor conocida como DM tipo MODY (por su sigla en inglés Maturity Onset Diabetes of the Young). Esta última representa de un 1 a un 5% de todos los casos de diabetes y ha suscitado gran interés por parte de la comunidad científica en los últimos años. El estudio de la DM MODY ha probado ser de utilidad para comprender aspectos etiológicos y biológicos generales de la

¹ AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. En: *Diabetes Care*. Enero, 2014, Vol. 38 no. 2., p. 81–90.

² WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | 10 facts about diabetes [En línea]. Genova: Global Report on Diabetes. World Health Organization. 2016. (Recuperado en 15 de julio de 2016) Disponible en <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/>.

³ LACHANCE, Carl-Hugo. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. En: *Canadian Journal of Diabetes*. Noviembre, 2016.

DM⁴ y su prevalencia es la más alta entre las formas monogénicas ^{5,6}. La DM MODY es una enfermedad autosómica dominante por lo que se da en condiciones de heterocigosis en genes de exclusiva localización autosómica nuclear. Las mutaciones responsables de DM MODY pueden aparecer en cualquiera de los siguientes genes; *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PDX1*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11* Y *APPL1* ⁷. Sin embargo se dan en *HNF1A* y *GCK* aproximadamente en el 70% de los casos⁸.

La fisiopatología de la DM tipo MODY es ampliamente comprendida; sin embargo, su diagnóstico sigue presentando varias dificultades. Signos clínicos como diagnóstico temprano de diabetes, ausencia de autoanticuerpos, nivel de péptido C normal, ausencia de eventos de cetosis y nivel de hemoglobina glicosilada moderado, son con frecuencia asociados a DM tipo MODY ^{9, 10}. Sin embargo, ninguno de estos permite el diagnóstico ya que suelen aparecer casos contradictorios, tales como pacientes MODY con presencia de anticuerpos anti-pancreáticos¹¹ y es sabido que el rango de anormalidad de algunos de estos signos es muy amplio, compartido con formas más comunes de DM y varía dependiendo del subtipo de MODY. Debe tenerse en cuenta que la DM tipo MODY es una entidad

⁴ FLANNICK, Jason; JOHANSSON, Stefan, y NJØLSTAD, Pål. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. En: *Nature Reviews Endocrinology*. Abril, 2016, Vol. 12 no. 7., p. 394–406.

⁵ FAJANS, Stefan; BELL, Graeme, y POLONSKY, Kenneth. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. En: *English Journal*. Septiembre, 2001, Vol. 345 no.13., p. 971–980.

⁶ MOLVEN, Anders, y NJØLSTAD, Pål. Role of molecular genetics in transforming diagnosis of diabetes mellitus. En: *Expert Review in Molecular Diagnosis*. 2012, Vol. 11 no. 3., p. 313–320.

⁷ FLANNICK, *Ibíd*, p. 394–406.

⁸ BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, et al. The Type and the Position of HNF1A Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)-3. En: *Diabetes*. Febrero, 2008, Vol. 57 no. 10., p. 503–508.

⁹ CHAMBERS, Christina, et al. Characteristics of maturity onset diabetes of the young in a large diabetes center. En: *Pediatric Diabetes*. Mayo, 2015, Vol. no. 1., p. 1–8.

¹⁰ KLEINBERGER, Jeffrey y POLLIN, Toni. Undiagnosed MODY: Time for Action. En: *Current Diabetes Reports*. 2015, Vol. 15 no. 12., p. 1-17.

¹¹ URBANOVÁ, Jana, et al. Positivity for islet cell autoantibodies in patients with monogenic diabetes is associated with later diabetes onset and higher HbA1c level. En: *Diabetic Medicine*. 2014, Vol. 31 no. 4., p. 466–471.

heterogénea cuya forma de presentación clínica dependerá del gen afectado. Adicional a esto hay que sumar que incluso ciertas características genéticas son compartidas con formas de DM más comunes como la DM2, llevando a la confusión¹². Las anteriores limitantes hacen que el diagnóstico de la DM tipo MODY sea un acontecimiento lejano de lo habitual lo cual dificulta el estudio de la enfermedad (Tan solo en EEUU se calcula que un 95% de pacientes MODY son mal diagnosticados)¹³.

En la actualidad el método diagnóstico estándar de la DM tipo MODY es la secuenciación Sanger ¹⁴, en donde el objetivo es encontrar mutaciones patogénicas en genes MODY. En un paciente, el hallazgo de una mutación patogénica en un gen MODY implica el diagnóstico automático del subtipo lo cual trae beneficios al paciente. Es así como pacientes con los subtipos MODY3-*HNF1A* o MODY1-*HNF4A* entre otros, pueden reemplazar una terapia con insulina por un tratamiento con sulfonilureas, incluso si ha pasado mucho tiempo desde el diagnóstico de hiperglucemia¹⁵.

La prevalencia de subtipos de MODY varía entre diferentes estudios. Estas variaciones se deben tanto a diferentes métodos de reclutamiento de pacientes¹⁶, como a diferencias genéticas entre las poblaciones evaluadas. Esto se evidencia en algunas poblaciones en donde a diferencia de muchos estudios la frecuencia

¹² OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: Diabetic Medicine. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

¹³ KLEINBERGER, Jeffrey y POLLIN, Toni. Undiagnosed MODY: Time for Action. En: Current Diabetes Reports. 2015, Vol. 15 no. 12., p. 1-17.

¹⁴ AMED, Shazhan, y ORAM, Richard. Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): Making the Right Diagnosis to Optimize Treatment. En: Canadian Journal of Diabetes. Marzo, 2016, p. 1–6.

¹⁵ TIMSIT, José, et al. Searching for Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): When and What for? En: Canadian Journal of Diabetes. 2016, p. 1–7.

¹⁶ OSBAK, Kara, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. En: Human Mutation. 2009, Vol. 30 no. 11., p. 1512–1526.

relativa de *MODY2-GCK* es mayor a la de *MODY3-HNF1A* ^{17, 18}. A nivel mundial *MODY3-HNF1A* es el subtipo de *MODY* más prevalente, debido a evidencia proveniente de diversos estudios en distintas poblaciones en los cuales la frecuencia relativa de este subtipo es mayor, es el caso de estudios de México, Noruega, Dinamarca, Finlandia, Suecia y las islas británicas^{19, 20, 21, 22, 23, 24}. En Latinoamérica un abordaje utilizado para estudiar las causas de la DM familiares de inicio juvenil ha sido analizar los genes más prevalentes como *HNF1A* y *GCK*. En Colombia no existen estudios de este tipo por lo que gran parte de la etiología de estas enfermedades se desconoce.

En este trabajo se estudiaron seis exones de *HNF1A* en 104 pacientes con diagnóstico de DM recibido entre los 2 y los 30 años (inicio juvenil) provenientes de 4 centros de atención en salud de Colombia. Se identificaron cinco variantes en la población de estudio de las cuales dos son variantes silenciosas polimórficas. Las tres variantes restantes generan cambios no sinónimos de aminoácidos (c.475C>T, c.481G>A y c.1460G>A), de estas solo c.475C>T presentó muy alta probabilidad de ser patogénica de acuerdo con el uso de dos criterios de clasificación: el del Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) (Probablemente Patogénica; PP)

¹⁷ CHÈVRE, Jean-Claude, et al. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other *MODY* genes. En: *Diabetologia*. Abril, 1998, Vol. 41, no. 9., p. 1017–1023.

¹⁸ ESTALELLA, Itziar, et al. Mutations in *GCK* and *HNF-1 α* explain the majority of cases with clinical diagnosis of *MODY* in Spain. En: *Clinical Endocrinology*. Abril, 2007, Vol. 67 no. 4., p. 538–546.

¹⁹ DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, Aarón, et al. Mutations in *MODY* genes are not common cause of early-onset type 2 diabetes in Mexican families. En: *Journal of the Pancreas*. Mayo 2005, 6(3), 238–245.

²⁰ EIDE, Sian, et al. Prevalence of *HNF1A* (*MODY3*) mutations in a Norwegian population (the HUNT2 Study). En: *Diabetic Medicine*. Abril, 2008, Vol. 25 no. 7., p. 775–781.

²¹ FRAYLING, Timothy, 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. En: *Diabetes*. Abril, 1997 Vol. 46., p. 720-725.

²² FURUZAWA, Gilberto, et al. Low prevalence of *MODY2* and *MODY3* mutations in Brazilian individuals with clinical *MODY* phenotype. En: *Diabetes Research and Clinical Practice*. Junio, 2008, Vol. 81, no. 3., p. 12–14.

²³ LEHTO, Markku, et al. High frequency of mutations in *MODY* and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. En: *Diabetologia*. 1999, Vol. 42 no. 9., p. 1131–1137.

²⁴ JOHANSEN, Erick, et al. Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in *HNF4A*, *GCK*, and *TCF1*. En: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Mayo, 2005, Vol. 90 no. 8., p. 4607–4614.

y el de la guía de buenas prácticas para el diagnóstico Genético-Molecular de la DM MODY (BPGM) (Patogénica; P)^{25, 26}.

Se identifican cinco variantes previamente reportadas en otros estudios, registrando el primer caso clínico de diabetes MODY confirmado por secuenciación en Colombia. La mutación responsable c.475C>T aparece en un paciente con características clínicas de DM MODY subtipo 3 incluyendo glucosuria y ausencia de eventos de cetosis o cetoacidosis. En este estudio la mutación r.682G>A considerada patogénica en DM MODY se registra en un paciente con valores positivos para anticuerpos el cual es diagnosticado como diabético tipo 1. Se recomienda considerar el tratamiento con sulfonilureas en este paciente ya que la respuesta a este tratamiento en pacientes con auto-anticuerpos con observación mutación patogénica en *HNF1A* puede ser similar a la observada en pacientes sin auto-anticuerpos²⁷. Se espera que este estudio contribuya al conocimiento de las causas de la DM de inicio juvenil en Colombia. Se recomienda aumentar la muestra analizada, secuenciar el resto de *HNF1A* e incluir otros genes implicados como *GCK* y *HNF4A*, así como el uso de metodologías de secuenciación de siguiente generación.

²⁵ CAETANO, Lilian, et al. Clinical application of ACMG-AMP guidelines in HNF1A and GCK variants in a cohort of MODY families, (November 2016). Febrero, 2017, p. 388–396.

²⁶ ELLARD, Sian; BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, y HATTERSLEY, Andrew. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. En: Diabetologia. Enero, 2008, Vol. 51 no. 4., p. 546–553.

²⁷ URBANOVÁ, Jana, et al. Should the negativity for islet cell autoantibodies be used in a prescreening for genetic testing in maturity-onset diabetes of the young? The case of autoimmunity-associated destruction of pancreatic ??-cells in a family of HNF1A-MODY subjects. En: International Archives of Allergy and Immunology. 2013, Vol. 161 no. 3., p. 279–284.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Identificar qué mutaciones en la secuencia codificante del gen *HNF1A* pueden encontrarse en una población de pacientes con sospecha diagnóstica de DM tipo MODY en Santander (Colombia).

1.2. Objetivos específicos

1. Secuenciar los exones 2 al 7 del gen HNF1A.
2. Identificar las variantes genéticas en la población de sujetos con sospecha diagnóstica de DM tipo MODY.
3. Clasificar las variantes según su patogenicidad y relacionarlas con el fenotipo clínico.

2. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la *diabetes mellitus* (DM)

La DM es el nombre por el que se conoce un conjunto de enfermedades metabólicas cuyo principal síntoma es la hiperglucemia. El efecto crónico de la hiperglucemia se asocia con complicaciones a largo plazo que afectan los órganos internos y las extremidades, disminuyendo la calidad de vida de los afectados²⁸. A nivel mundial se cuentan 347 millones de personas afectadas, de las cuales más de 15 millones se encuentran en Latinoamérica (datos de 2011). Se prevé que para el año 2021 la cifra en esta región del mundo alcance los 20 millones de persona. La gran mayoría de casos de DM quedan incluidos en dos categorías; DM tipo 1 (DM1) y DM tipo 2 (DM2). En la DM1 se presenta una deficiencia completa de insulina la cual es debida al ataque autoinmune de las células productoras de la hormona. Esta se puede diagnosticar por la positividad para auto-anticuerpos anti-pancreáticos y la detección de algunos marcadores moleculares. La DM2 es más compleja pues en su fisiopatología intervienen la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos y una inadecuada respuesta secretora del organismo insuficiente para compensar dicha resistencia. Generalmente la DM2 causa efectos patológicos subclínicos en el organismo antes de ser detectada, situación que puede darse midiendo la glucosa en ayunas, mediante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (Oral Glucose Tolerance Test; OGTT) o midiendo los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c)²⁹. En este contexto podría hablarse de una tercera categoría de DM, en la que caben DM debidas a la perdida de la capacidad secretora del organismo por causas genéticas. En estas DM intervienen mutaciones en genes que cumplen funciones importantes en el metabolismo de los carbohidratos. Este es el caso de las DM

²⁸ AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. En: Diabetes Care. Enero, 2014, Vol. 38 no. 2., p. 81–90.

²⁹ Ibíd, p. 81-90.

monogénicas tema que se discutirá después de abordar como se da el metabolismo de carbohidratos normal en el ser humano.

2.2. Funcionamiento de las células beta-pancreáticas

Las células beta-pancreáticas cumplen un rol fundamental en la regulación de los niveles de azúcar en sangre lo cual realizan a través de la secreción de la hormona insulina. Al consumir los alimentos los niveles de glucosa en sangre se incrementan drásticamente lo cual ocasiona la entrada masiva de moléculas de glucosa a las células beta-pancreáticas por difusión facilitada. Bajo condiciones normales de salud la glucosa al ser absorbida desencadena los cambios que permiten la liberación de insulina y la posterior regulación de los niveles de azúcar en sangre. Una vez en el citoplasma la glucosa puede convertirse en glucosa 6P por acción enzimática de la glucoquinasa 6 (GCK) y quedar secuestrada en el interior de la célula beta-pancreática para seguir en la vía glicolítica generadora de ATP. El exceso de G6P en la célula beta se va regulando cuando estas moléculas ingresan en la vía glicolítica, ciclo de Krebs y cadena respiratoria incrementando drásticamente la proporción ATP/ADP. En ese estado los canales de potasio sensibles al ATP (K_{ATP}) que bajo condiciones espontaneas permanecen abiertos, forman un complejo con ATP y como respuesta se cierran. Este cierre genera una despolarización celular que abre los canales de Ca en membrana, permitiendo el ingreso de Ca al citoplasma y su liberación de depósitos intracelulares. El Ca es un ion con carga positiva por tanto su ingreso revierte el potencial de reposo de la célula beta, esto lleva a la liberación de vesículas de insulina al torrente sanguíneo. El hígado, el tejido adiposo y el muscular poseen receptores de insulina y son los tejidos encargados de disminuir los niveles de glucosa toda vez son activados por la insulina. La absorción de glucosa del torrente sanguíneo por parte de los tejidos puede incrementarse exponencialmente cuando los tejidos muscular y adiposo son activados en estado postprandial por la hormona insulina. Esta activación lleva a la biodisponibilidad inmediata del transportador de glucosa sensible a insulina GLUT4

en estos tejidos siendo un factor importante para la disminución de la glucosa en sangre hasta sus niveles normales (5.5 Mm)³⁰.

2.3. Diabetes monogénicas

Las diabetes monogénicas agrupan en conjunto la diabetes neonatal (DMN), las diabetes mitocondriales (DMM) y la DM tipo MODY³¹, se estima que 1/13000 padece algún tipo de diabetes monogénica. Estas son causadas por mutaciones en un único gen, razón por la cual toda diabetes monogénica exhibe herencia mendeliana. A esto se debe que la patofisiología de la diabetes monogénica sea ampliamente entendida, al contrario de lo que ocurre en formas más comunes de la enfermedad.

La DMN es debida a un fallo en las células beta-pancreáticas y puede ocasionar bajo peso al nacer debido a que la insulina además de hormona también es un factor de crecimiento. Esta enfermedad se presenta como una diabetes ocurriendo antes de los primeros seis meses de vida, los médicos distinguen dos formas; la transitoria (DMNT) la cual se “cura” después de tres meses (pero suele volver transformada en un tipo de DM2) y la permanente (DMNP) que continua de por vida. La DMN tiene muchas y variadas causas genéticas; mutaciones dobles asociadas a consanguinidad en genes tales como *GCK*, *PDX1*, *INS*, *PTF1A*, *RFX6* y *EIF2AK3* pueden causar DMN. Sin embargo, con mayor frecuencia la DMN se debe a anomalías cromosómicas y de secuencia del 6q24 (incluyendo mutaciones puntuales en *ZFP57*) y mutaciones que afectan gravemente la función de algunos genes cuyas mutaciones leves se asocian con MODY, incluyendo *ABCC8*, *KCNJ11* y el mismo *INS*. Algunas diabetes reconocidas como diabetes sindrómicas se identifican clínicamente como DMN al aparecer antes de los 6 primeros meses de

³⁰ MAASSEN, Johannes; JANSSEN, George, y HART, Leen. Molecular mechanisms of mitochondrial diabetes (MIDD). En: *Annals of Medicine*. 2005, Vol. 37 no. 3., p. 213–221.

³¹ FLANNICK, Jason; JOHANSSON, Stefan, y NJØLSTAD, Pål. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. En: *Nature Reviews Endocrinology*. Abril, 2016, Vol. 12 no. 7., p. 394–406.

vida, sus causas pueden incluir mutaciones en genes asociados (*HNF1B*, *KCNJ11A*, *ABCC8*, *NEUROD1*) o no asociados con DM tipo MODY (*PTF1A*, *RFX6*, *EIF2AK3*, *FOXP3*, *WFS1*)^{32, 33}.

Diferentes mutaciones en el ADN mitocondrial dentro de las cuales se destaca A3243G del gen del ARN ribosomal16s, causan DMM, mejor conocida como Diabetes de Herencia Materna y sordera (DHMS). Estas alteraciones genéticas deterioran la capacidad secretora de insulina de las células beta-pancreáticas, se cree que el mecanismo patológico simula un envejecimiento celular más rápido de lo normal. En los pacientes afectados las células beta-pancreáticas tienen la funcionalidad de las de una persona mucho mayor. El mecanismo responsable del envejecimiento celular sería una menor tasa de síntesis proteica, ya que las mutaciones alteran moléculas relacionadas con este proceso incluyendo ARN ribosomal y de transferencia. En el caso de alteraciones genéticas mayores (Ej. Deleciones), se presenta una diabetes que se asemeja a una DM1 y la muerte prematura del afectado. Como su nombre lo indica, esta enfermedad es de herencia materna ya que el ADN mitocondrial paterno se pierde durante la fecundación³⁴.

Como podemos ver en estos ejemplos, en diabetes monogénicas la contribución medioambiental es mínima lo cual simplifica su estudio. Esto ha permitido entender aspectos de la biología general de la DM que de otra manera no hubieran podido entenderse. Mutaciones heterocigotas del gen *CEL* (gen MODY No. 8) (cuya expresión tiene lugar únicamente en células acinares del páncreas), permitieron confirmar que disfunciones en tipos celulares distintos a las células beta-pancreáticas pueden llevar al desarrollo de DM. Así mismo el rol de la enzima

³² FLANNICK, Jason; JOHANSSON, Stefan, y NJØLSTAD, Pål. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. En: Nature Reviews Endocrinology. Abril, 2016, Vol. 12 no. 7., p. 394–406.

³³ MOLVEN, Anders, y NJØLSTAD, Pal. Role of molecular genetics in transforming diagnosis of diabetes mellitus. En: Expert Review in Molecular Diagnosis. 2012, Vol. 11 no. 3., p. 313–320.

³⁴ MAASSEN, Johannes; JANSSEN, George, y HART, Leen. Molecular mechanisms of mitochondrial diabetes (MIDD). En: Annals of Medicine. 2005, Vol. 37 no. 3., p. 213–221.

glucoquinasa GCK como sensor de niveles de glucosa en el organismo, fue descubierto gracias al estudio del efecto de sus mutaciones en pacientes con DM tipo MODY y DMN³⁵. Por otro lado, las formas monogénicas presentan características clínicas y genéticas compartidas con formas de DM más comunes como la DM2, de manera que los avances que realizados en ambos campos podrían otorgar mutuos beneficios. Es así, como se contempla la idea de probar la medicación de pacientes con diabetes monogénica (*MODY3-HNF1A*) en pacientes DM2. La evidencia muestra que la variante p.E508K de *HNF1A* aunque no ocasiona MODY, incrementa 5 veces el riesgo de padecer DM2. Aquellos pacientes con esta variante y DM2 podrían tener una forma atenuada de MODY. De manera que estos pacientes probablemente serían sensibles a la misma medicación empleada con éxito en pacientes *MODY3-HNF1A*. Esto podría traer diversos beneficios que mejorarían la calidad de vida de estos pacientes, ya que las sulfonilureas, medicación aplicada en pacientes *MODY3-HNF1A* es de aplicación oral y en algunos casos reemplaza la insulina³⁶.

2.4. Diabetes mellitus tipo MODY

La DM tipo MODY es la forma más prevalente de diabetes monogénica³⁷, pudiendo afectar entre un 1 y un 5% de la población diabética³⁸. Los síntomas de MODY aparecen entre los 6 meses y los 35 años en forma de hiperglicemia no cetónica con un patrón de herencia autosómico dominante³⁹. Los pacientes con DM tipo MODY suelen tener un menor nivel de hemoglobina glicosilada que otros pacientes

³⁵ FLANNICK, Jason; JOHANSSON, Stefan, y NJØLSTAD, Pål. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. En: *Nature Reviews Endocrinology*. Abril, 2016, Vol. 12 no. 7., p. 394–406.

³⁶ FLANNICK, *ibid*, p. 394–406.

³⁷ MOLVEN, Anders, y NJØLSTAD, Pal. Role of molecular genetics in transforming diagnosis of diabetes mellitus. En: *Expert Review in Molecular Diagnosis*. 2012, Vol. 11 no. 3., p. 313–320.

³⁸ FAJANS, Stefan; BELL, Graeme, y POLONSKY, Kenneth. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. En: *English Journal*. Septiembre, 2001, Vol. 345 no.13., p. 971–980.

³⁹ FLANNICK, *Op. Cit*, p. 394–406.

diabéticos, un nivel de péptido C normal y dan negativo en pruebas de detección de anticuerpos anti-pancreáticos⁴⁰. Sin embargo, se presentan excepciones a lo anterior y por tanto no existe ningún signo clínico que por si solo permita el tamizaje de pacientes MODY. Dado que la DM tipo MODY comparte muchas de sus características clínicas con otras formas de DM 95% de casos pueden permanecer sin diagnosticar⁴¹. Se recomiendan estar alerta ante DM en pacientes jóvenes que dan negativo en pruebas de auto-anticuerpos⁴².

La DM tipo MODY es una identidad heterogénea, ya que se reconocen al momento 14 subtipos denominados según el gen afectado; MODY1-*HNF4A*, MODY2-*GCK*, MODY3-*HNF1A*, MODY4-*PDX1*, MODY5-*HNF1B*, MODY6-*NEUROD1*, MODY7-*KLF11*, MODY8-*CEL*, MODY9-*PAX4*, MODY10-*INS*, MODY11-*BLK*, MODY12-*ABCC8*, MODY13-*KCNJ11*, y MODY14-*APPL1* recientemente descubierto^{43, 44}. Los subtipos de MODY más comunes son MODY2-*GCK* y MODY3-*HNF1A* los cuales en conjunto representan el 70% de casos. La proporción MODY2/MODY3 varía entre los estudios ya sea debido a diferentes estrategias de reclutamiento de pacientes o en últimas a diferente constitución genética de las poblaciones⁴⁵. A continuación, se da una breve descripción de los subtipos de MODY.

MODY1: se debe a mutaciones en el Factor Nuclear 4 α del Hepatocito *HNF4A* y aunque fue el primer gen en ser asociado a la enfermedad, solo causa del 5 a 10%

⁴⁰ CHAMBERS, Christina, et al. Characteristics of maturity onset diabetes of the young in a large diabetes center. En: *Pediatric Diabetes*. Mayo, 2015, Vol. no. 1., p. 1–8.

⁴¹ KLEINBERGER, Jeffrey y POLLIN, Toni. Undiagnosed MODY: Time for Action. En: *Current Diabetes Reports*. 2015, Vol. 15 no. 12., p. 1-17.

⁴² CHAMBERS, Op. Cit, p. 1–8.

⁴³ FLANNICK, Jason; JOHANSSON, Stefan, y NJØLSTAD, Pål. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. En: *Nature Reviews Endocrinology*. Abril, 2016, Vol. 12 no. 7., p. 394–406.

⁴⁴ LIMA, Renata, et al. Maturity-onset diabetes of the young (MODY) in Brazil: Establishment of a national registry and appraisal of available genetic and clinical data. En: *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2017, Vol. 123., p. 134–142.

⁴⁵ ELLARD, Sian; BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, y HATTERSLEY, Andrew. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. En: *Diabetologia*. Enero, 2008, Vol. 51 no. 4., p. 546–553.

de todos los casos⁴⁶, otras fuentes refieren menos casos asociándolo con solo un 8% del total⁴⁷. *HNF4A* registra 149 variantes⁴⁸, de las cuales se contaba con el registro de 103 asociadas a MODY en 173 familias en el año 2014⁴⁹. MODY1-*HNF4A* presenta un comportamiento clínico similar a MODY3-*HNF1A*, incluyendo alta sensibilidad a las sulfonilureas, pero a diferencia de los pacientes MODY3-*HNF1A* los pacientes MODY1-*HNF4A* presentan un umbral renal normal. MODY1 aparece como hiperglicemia progresiva que se convierte en diabetes durante la adolescencia o a inicios de la adultez⁵⁰.

MODY2: es causado por mutaciones en el gen de la glucoquinasa *GCK* el cual tiene 12 exones y codifica tres isoformas que se expresan en hígado, células β pancreáticas, cerebro y células endocrinas del intestino. Se observan diferencias en las funciones celulares de cada isoforma. Mientras que en hepatocitos la isoforma 2 permite la absorción de glucosa, la glucólisis y la síntesis de glucógeno, en células β pancreáticas la isoforma 1 cumpliendo la misma función que en hígado regula la excreción de insulina^{51, 52}. *GCK* registra 778 variantes⁵³ de estas 620 registraron asociación con MODY en el año 2014. En *GCK* las mutaciones aparecen en todos los exones, la región mínima promotora y regiones intrónicas flanqueantes, pero con mayor frecuencia ocurren en los exones 7 y 9. La evidencia muestra que el fenotipo

⁴⁶ OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: *Diabetic Medicine*. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

⁴⁷ REGINA, Moises; REIS, Andre, y MOREL, Valerie. Prevalence of Maturity-Onset Diabetes of the Young Mutations in Brazilian Families With Autosomal-Dominant Early-Onset Type 2 Diabetes. En: *Diabetes Care*. 2001, Vol. 24 no. 4., p. 786–797.

⁴⁸ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: *Genome Medicine*. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

⁴⁹ COLCLOUGH, Kevin, et al. Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *European Journal of Human Genetics*, Enero, 2014, Vol. 22., p. 1–6.

⁵⁰ OWEN, Op. Cit, p. 260–266.

⁵¹ OSBAK, Kara, et al. Update on mutations in glucokinase (*GCK*), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. En: *Human Mutation*. 2009, Vol. 30 no. 11., p. 1512–1526.

⁵² NEGAHDAR, Maria, et al. (2014). *GCK*-MODY diabetes as a protein misfolding disease: The mutation R275C promotes protein misfolding, self-association and cellular degradation. En: *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014, Vol. 382 no. 1., p. 55–65.

⁵³ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: *Genome Medicine*. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

clínico es el mismo independientemente de la localización de la mutación dentro del gen⁵⁴, sin embargo entre pacientes MODY2 se presenta variabilidad en la severidad de la enfermedad⁵⁵ cuya causa es materia de debate.

MODY3: son pacientes con mutaciones de pérdida de función en el gen del Factor Nuclear 1α del Hepatocito *HNF1A*. Este gen posee 10 exones y expresa tres isoformas; A, B y C. La isoforma A comprende los 10 exones completos que incluyen los tres dominios de *HNF1A*; dominio NH2 de dimerización, dominio de unión a ADN y dominio COOH de trans-activación⁵⁶. Esta isoforma se expresa predominantemente en riñón e hígado⁵⁷. Las isoformas B y C, se originan por empalme alternativo y comprenden los primeros siete y seis exones respectivamente⁵⁸. Ambas isoformas se expresan en tejido pancreático en mayor proporción que la isoforma A⁵⁹. *HNF1A* cuenta con un menor registro de variantes que *GCK*; 519 en total⁶⁰. En el año 2014 se registraron 414 mutaciones de *HNF1A* asociadas a MODY en 1247 familias⁶¹. En las mutaciones de *HNF1A* sucede que presentan variabilidad en el fenotipo clínico de acuerdo con la localización. Si las mutaciones afectan los exones 1 al 6 afectan las tres isoformas y la enfermedad tiene mayor grado de severidad, en cambio si la mutación afecta solo los exones 7

⁵⁴ COLCLOUGH, Kevin, et al. Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *European Journal of Human Genetics*, Enero, 2014, Vol. 22., p. 1–6.

⁵⁵ LACHANCE, Carl-Hugo. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. En: *Canadian Journal of Diabetes*. Noviembre, 2016.

⁵⁶ BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, et al. The Type and the Position of *HNF1A* Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)-3. En: *Diabetes*. Febrero, 2008, Vol. 57 no. 10., p. 503–508.

⁵⁷ HARRIES, Lorna, et al. Isoforms of the *TCF1* gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. En: *Human Molecular Genetics*. Junio, 2006, Vol. 15 no. 14., p. 2216–2224.

⁵⁸ BELLANNÉ-CHANTELOT, Op. Cit, p. 503-508.

⁵⁹ HARRIES, Op. Cit, p. 2216–2224.

⁶⁰ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: *Genome Medicine*. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

⁶¹ COLCLOUGH, Op. Cit, p. 1–6.

al 10, el grado de severidad será menor⁶². Las mutaciones en *HNF1A* se reportan en sus exones, región mínima promotora y regiones intrónicas flanqueantes, pero se ha registrado mayor frecuencia de estas en los exones 2 y 4⁶³. Específicamente se habla de la mutación P291fsinsC en el exón 4 de *HNF1A* como un punto crítico mutacional, ya que se ha encontrado la misma mutación en familias no relacionadas⁶⁴. Por otra parte *MODY3* suele ser el subtipo más prevalente de *MODY* a nivel mundial con una frecuencia del 21% al 65% de todos los casos^{65, 66}. Por lo anterior *HNF1A* es un candidato para realizar tamizaje inicial de la extensión de la DM tipo *MODY* en una población no estudiada. El fenotipo clínico *MODY3* asemeja al fenotipo *MODY* de genes aparentemente involucrados en las mismas rutas de señalización (Ej. *MODY1*). Durante la etapa neonatal estos pacientes pueden sufrir de hipoglicemia y macrosomía debido a razones pobremente estudiadas. Al igual que *MODY1* el fenotipo clínico se manifiesta como diabetes en la adolescencia o al inicio de la adultez, y son sensibles a las sulfonilureas, pero como característica distintiva estos pacientes presentan un bajo umbral renal⁶⁷.

MODY4: este subtipo es producido por mutaciones en *IPF1*, el gen que codifica el factor promotor de la insulina mejor conocido como homeobox Pancreático y Duodenal 1 (*PDX1*)⁶⁸. *PDX1* presenta 2 exones y es un factor de transcripción del

⁶² BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, et al. The Type and the Position of *HNF1A* Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (*MODY*)-3. En: *Diabetes*. Febrero, 2008, Vol. 57 no. 10., p. 503–508.

⁶³ COLCLOUGH, Kevin, et al. Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *European Journal of Human Genetics*, Enero, 2014, Vol. 22., p. 1–6.

⁶⁴ KAISAKI, Pamela, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in *MODY* and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. En: *Diabetes*. 1997, Vol. 46, No. 3, p. 528–535.

⁶⁵ REGINA, Moises; REIS, Andre, y MOREL, Valerie. Prevalence of Maturity-Onset Diabetes of the Young Mutations in Brazilian Families With Autosomal- Dominant Early- Onset Type 2 Diabetes. En: *Diabetes Care*. 2001, Vol. 24 no. 4., p. 786–797.

⁶⁶ LACHANCE, Carl-Hugo. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. En: *Canadian Journal of Diabetes*. Noviembre, 2016.

⁶⁷ OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: *Diabetic Medicine*. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

⁶⁸ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: *Nucleic Acids Research*. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

tipo homeodominio al igual que *HNF1A* y *HNF4A*. *PDX1* aumenta la expresión de genes relacionados con la vía glicolítica y la producción de insulina como *GCK* o *INS*⁶⁹. Este gen reporta 30 variantes de las cuales la mayoría se asocia a DMN⁷⁰ lo cual va en concordancia con reportes de asociación con agénesis pancreática⁷¹. El *MODY4* es una forma muy rara de *MODY* reportada en 5 familias o menos⁷² y su espectro de características clínicas comparte muchas cosas con *MODY1-HNF4A* y *MODY3-HNF1A*⁷³.

MODY5: se asocia con un 5 a 10% de los casos de DM tipo *MODY*⁷⁴ y es producido por el gen del Factor Nuclear 1β del Hepatocito *HNF1B*. Este gen posee 11 exones⁷⁵ y registra 203 variantes con más de 50 asociadas a DM tipo *MODY*⁷⁶. *HNF1B* se expresa desde etapas tempranas del desarrollo en muchos tejidos incluyendo riñón, hígado, ductos biliares, timo, tracto genital, páncreas, pulmón e intestino⁷⁷. Se tiene evidencia de tres isoformas (A, B y C) para *HNF1B*⁷⁸. El fenotipo clínico de *MODY5-HNF1B* es complejo ya que raramente se presenta como diabetes nada más. Por lo general en estos pacientes se observa un síndrome del desarrollo renal, acompañado de anomalías en páncreas y tracto genito-urinario que casi siempre desemboca en enfermedad cística renal⁷⁹. Estos síntomas llevan a que los

⁶⁹ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: Nucleic Acids Research. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

⁷⁰ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: Genome Medicine. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

⁷¹ FLANNICK, Jason; JOHANSSON, Stefan, y NJØLSTAD, Pål. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. En: Nature Reviews Endocrinology. Abril, 2016, Vol. 12 no. 7., p. 394–406.

⁷² OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: Diabetic Medicine. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

⁷³ HATTERSLEY, Andrew. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. En: Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association. Octubre, 1998, Vol. 15 no. 1., p. 15–24.

⁷⁴ OWEN, Op. Cit, p. 260–266.

⁷⁵ GEER, Op. Cit, p. 492–496.

⁷⁶ STENSON, Op. Cit, p. 13.

⁷⁷ EDGHILL, Eduard, et al. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. En: Journal of Medical Genetics. 2006, Vol. 43 no. 1., p. 84–90.

⁷⁸ GEER, Lewis, Op. Cit, 492–496.

⁷⁹ OWEN, Op. Cit, p. 260–266.

pacientes MODY5 corran mayor riesgo de falla renal que otros subtipos. Algunos autores prefieren referirse a esta enfermedad como síndrome de diabetes y cistes renales⁸⁰.

MODY6: es producido por mutaciones en el gen de Diferenciación Neurogénica 1 *NEUROD1*. *NEUROD1* presenta 2 exones⁸¹ y 4 mutaciones asociadas al MODY⁸². Este gen también es conocido bajo el nombre de transactivador 2 de la secuencia caja-E de la célula beta (*BETA2*). En células beta-pancreáticas *NEUROD1* forma un heterodímero con el también factor de transcripción E47 (de expresión ubiquita). Una vez unido a E47, *NEUROD1* regula la expresión de insulina uniéndose a una secuencia caja-E localizada en el promotor de *INS*⁸³. El MODY6 se cataloga como un subtipo poco frecuente pues se ha reportado en 5 familias o menos⁸⁴.

MODY7: producido por mutaciones en el Factor 11 tipo Kruppel *KLF11* (Kruppel-like factor 11). *KLF11* es un factor de transcripción capaz de activar del gen de la insulina (*INS*). Este gen posee 6 exones y presenta evidencia de codificar tres transcritos y dos isoformas⁸⁵. Al momento se registran solo 5 variantes en este gen⁸⁶. Al igual que el anterior subtipo este es una forma rara de MODY reportada en 5 familias o menos⁸⁷.

⁸⁰ MITCHELL, Simon, y FRAYLING, Timothy. The role of transcription factors in maturity-onset diabetes of the young. En: *Molecular Genetics and Metabolism*. 2002, Vol. 77 no. 1–2., p. 35–43.

⁸¹ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: *Nucleic Acids Research*. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

⁸² STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: *Genome Medicine*. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

⁸³ NAYA, Francisco; STELLRECHT, Christine, y TSAI, Ming-Jer. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. En: *Genes & Development*. 1995, Vol. 9 no. 8., p. 1009–1019.

⁸⁴ OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: *Diabetic Medicine*. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

⁸⁵ GEER, Op. Cit, p. 492–496.

⁸⁶ STENSON, Op. Cit, p. 13.

⁸⁷ OWEN, Op. Cit, p. 260–266.

MODY8: es otra de las formas raras de MODY reportadas en 5 familias o menos⁸⁸. La Carboxil-Ester Lipasa (CEL) es una enzima que participa en la hidrólisis y absorción del colesterol y esteroides vitamínicos liposolubles. Esta enzima es secretada por el páncreas en el tracto digestivo y está codificada por el gen *CEL* el cual presenta 11 exones. Este gen reporta dos deleciones asociadas con DM tipo MODY y 13 variantes.

MODY9: hace parte de las formas de MODY reportadas en 5 familias o menos⁸⁹. *MODY9-PAX4* está relacionado con mutaciones en el gen del dominio pareado 4 (“Paired Box 4”) el cual reporta 12 exones y una isoforma⁹⁰. Este gen presenta 12 variantes, 2 de las cuales son mutaciones asociadas con DM tipo MODY^{91, 92}.

MODY10: la DM tipo MODY10 es producida por mutaciones en el gen de la preproinsulina (*INS*), el cual inicialmente se pensó que estaba relacionado exclusivamente con DMN debido a la gran cantidad de mutaciones que se asocian a esta. Fue en una familia de Noruega donde se encontró como causante de DM tipo MODY por primera vez (c.137G>A)⁹³, encontrándose responsable de menos del 1% de todos los casos⁹⁴. *INS* tiene tres exones⁹⁵ y registra 76 variantes, de las cuales 6 se relacionan con MODY⁹⁶.

⁸⁸ OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: *Diabetic Medicine*. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

⁸⁹ *Ibid*, p. 260–266.

⁹⁰ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: *Nucleic Acids Research*. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

⁹¹ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: *Genome Medicine*. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

⁹² OMIM. O. MENDELIAN I. IN M [En línea]. Baltimore MD: McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University. 2015. (Recuperado en 28 de septiembre de 2017) Disponible en <https://omim.org/>

⁹³ MOLVEN, Anders, et al. Mutations in the Insulin Gene Can Cause MODY and Autoantibody-Negative Type 1 Diabetes. En: *Diabetes*. Abril, 2008, Vol. 57., p. 1131–1135.

⁹⁴ OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: *Diabetic Medicine*. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

⁹⁵ GEER, Op. Cit, p. 492–496.

⁹⁶ STENSON, Op. Cit, p. 13.

MODY11: el proto-oncogén de la B linfoide tirosin-quinasa (*BLK*) “B lymphoid tyrosine kinase” es responsable de la DM tipo MODY11, una forma muy rara de MODY reportada en menos de 5 familias⁹⁷. *BLK* reporta 2 isoformas y 16 exones⁹⁸, codificando una quinasa no-receptora que participa en el desarrollo de células β pancreáticas al igual que muchos otros tipos celulares⁹⁹, ¹⁰⁰. La DM tipo MODY11 es el subtipo de MODY más polémico ya que falta evidencia para relacionar las mutaciones patogénicas de *BLK* con DM tipo MODY. En un principio, la mutación p.A71T así como otras cuatro mutaciones de las regiones no codificantes del gen fueron ligadas con un nuevo tipo de DM tipo MODY (MODY11)¹⁰¹. Sin embargo estudios posteriores demostraron falta de evidencia para dicha asociación, por lo cual la situación actual de este gen como causante de DM tipo MODY y por ende la existencia del DM tipo MODY11 sigue siendo incierta¹⁰². Actualmente *BLK* aparece con 17 variantes de las cuales una sola se relaciona con DM tipo MODY ¹⁰³.

MODY12: es causado por mutaciones activadoras en el gen del dispositivo de unión a ATP octavo miembro de la subfamilia C “ATP-binding cassette sub-family C member 8” (*ABCC8*)¹⁰⁴. *ABCC8* posee 39 exones ¹⁰⁵ y tiene tres isoformas;

⁹⁷ OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: Diabetic Medicine. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

⁹⁸ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: Nucleic Acids Research. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

⁹⁹ BONNEFOND, Amélie, et al. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified *KCNJ11* as the thirteenth MODY gene. En: PLoS ONE. Junio, 2012, Vol. 7 no. 6. P. 37-45.

¹⁰⁰ GEER, Op. Cit, p. 492–496.

¹⁰¹ BOROWIEC, Maciej, et al. Mutations at the *BLK* locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Junio, 2009, Vol. 106, p. 14460-14465.

¹⁰² BONNEFOND, Amélie, et al. Reassessment of the putative role of *BLK*-p.A71T loss-of-function mutation in MODY and type 2 diabetes. En: Diabetologia. Septiembre, 2013, Vol. 56 no. 3., p. 492–496.

¹⁰³ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: Genome Medicine. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

¹⁰⁴ BONNEFOND, Op. Cit, p. 37-45.

¹⁰⁵ BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, et al. *ABCC8* and *KCNJ11* molecular spectrum of 109 patients with diazoxide-unresponsive congenital hyperinsulinism. En: Journal of Medical Genetics. Enero, 2010, Vol. 47 no. 11., p. 752–759.

SUR1¹⁰⁶, SUR2A y SUR2B . Se reportan 612 variantes en este gen pero solo tres están relacionadas directamente con un fenotipo MODY¹⁰⁷, pues al igual que *KCNJ11* e *INS* las mutaciones patogénicas se asocian a DMN en mayor proporción. MODY12-*ABCC8* es responsable de menos del 1% de los casos de DM tipo MODY¹⁰⁸ pero presenta amplia opción de tratamiento, ya que el fenotipo clínico de este subtipo comparte con MODY13-*KCNJ11* y MODY3-*HNF1A* la sensibilidad a las sulfonilureas^{109, 110}

MODY13: se debe a mutaciones de ganancia de función en el gen de la subunidad KIR6.2 del hetero-octámero K-ATP (*KCNJ11*)¹¹¹. Estas mutaciones se presentan con una frecuencia menor al 1% y se asocian más con diabetes neonatal¹¹². K-ATP es el canal dependiente de ATP responsable de transportar potasio en la célula β pancreática formado por cuatro subunidades KIR6.2 que forman el poro y cuatro subunidades de SUR1 el receptor de sulfonilurea ¹¹³. Este gen posee un único exón ¹¹⁴ registrando 175 variantes¹¹⁵ una de las cuales (p.Glu227Lys) se relaciona con DM tipo MODY¹¹⁶.

MODY14: es causado por mutaciones en el gen de la proteína adaptadora de interacción fosfotirosin, dominio PH y con cremallera de leucina 1 (*APPL1*) (“Adaptor

¹⁰⁶ BOWMAN, Patrick, et al. Heterozygous *ABCC8* mutations are a cause of MODY. En: *Diabetologia*. Agosto, 2012, Vol. 55 no. 1., p. 123–127.

¹⁰⁷ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: *Genome Medicine*. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

¹⁰⁸ OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: *Diabetic Medicine*. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

¹⁰⁹ BONNEFOND, Amélie, et al. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified *KCNJ11* as the thirteenth MODY gene. En: *PLoS ONE*. Junio, 2012, Vol. 7 no. 6. P. 37-45.

¹¹⁰ BOWMAN, Op. Cit, p. 123–127.

¹¹¹ BONNEFOND, Op.Cit, p. 37-45.

¹¹² OWEN, Op. Cit, p. 260–266.

¹¹³ BONNEFOND, Op. Cit, p. 37-45.

¹¹⁴ BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, et al. *ABCC8* and *KCNJ11* molecular spectrum of 109 patients with diazoxide-unresponsive congenital hyperinsulinism. En: *Journal of Medical Genetics*. Enero, 2010, Vol. 47 no. 11., p. 752–759.

¹¹⁵ STENSON, Op. Cit, p. 13.

¹¹⁶ BONNEFOND, Op. Cit, p. 37-45.

Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH Domain, and leucine zipper-containing 1")¹¹⁷. *APPL1* reporta 23 exones y codifica para una proteína involucrada en regulación de proliferación celular, e interacciones entre la vía de la adiponectina y la vía de la insulina¹¹⁸. La proteína *APPL1* se une competitivamente a AKT evitando que se una su inhibidor TRIB3, el cual le impide a AKT llegar a la membrana celular. AKT es pieza clave en la vía de señalización de la insulina, ya que en la membrana plasmática se fosforila por el receptor de insulina y propaga la señal de activación. *APPL1* reporta dos mutaciones asociadas con MODY (c.1655T>A [p.Leu552*] y c.280G>A [p.Asp94Asn])¹¹⁹.

2.5. Estudios de *diabetes mellitus* tipo MODY en latinoamerica

A nivel Latinoamérica los trabajos han sido meramente descriptivos. Con relación a la prevalencia de diferentes subtipos de MODY el panorama es muy variado. Mientras MODY3 se encontró como la forma más común en un estudio realizado en el sur de Brasil¹²⁰, MODY2 lo fue en una población chilena¹²¹. En otros estudios fue la DM tipo MODY no identificada (MODYX) la más frecuente, en estos estudios MODY X hacía referencia a individuos sin evidencia de mutaciones en la secuencia de *HNF1A* y *GCK*. Hay que tener en cuenta que aparte de esta definición en la que el MODYX es MODY sin identificar para determinada población de un estudio o cohorte, otros autores definen MODYX como una DM tipo MODY en la cual se desconoce la causa genética (el gen MODY no ha sido identificado por ningún grupo de investigación en el mundo). Según esta otra definición para que un individuo sea

¹¹⁷ PRUDENTE, Sabrina, et al. Loss-of-Function Mutations in *APPL1* in Familial Diabetes Mellitus. En: American Journal of Human Genetics. 2015, Vol 97 no. 1, p. 177–185.

¹¹⁸ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: Nucleic Acids Research. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

¹¹⁹ PRUDENTE, Op. Cit, p. 177–185.

¹²⁰ MURUSSI, Jorge de Faria, et al. *HNF1α* Mutations Are Present in Half of Clinically Defined MODY Patients in South-Brazilian Individuals. En: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia (ABE&M). 2008, Vol. 52 no. 8., p. 1326–1331.

¹²¹ CODNER, Ethel, et al. Mild fasting hyperglycemia in children: High rate of glucokinase mutations and some risk of developing type 1 diabetes mellitus. En: Pediatric Diabetes. Enero, 2009, Vol. 10, no. 6., p. 382–388.

considerado MODYX se requiere del análisis completo de los 14 genes MODY conocidos en la actualidad. Lo anterior supone un alto coste, ya que requiere del análisis de la secuencia completa de 14 genes. Aun así, la categorización de MODYX como casos MODY carentes de mutaciones para *GCK* y *HNF1A* es útil al direccionar las investigaciones a genes MODY de menor prevalencia. MODYX llega a ser muy frecuente en países como México¹²² y Brasil¹²³, en este último, su prevalencia llega al 70% relativa a MODY 2 y MODY 3¹²⁴. Los estudios realizados en Latinoamérica reflejan otros datos interesantes pues se han descrito nuevas mutaciones para *GCK* en Brasil ^{125, 126, 127, 128, 129} y para *HNF1A* en Brasil ¹³⁰ y México^{131, 132}. La literatura científica en Colombia es nula ya que no se han realizado estudios y se desconoce por completo la prevalencia de mutaciones en genes MODY.

¹²² DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, Aarón, et al. Mutations in MODY genes are not common cause of early-onset type 2 diabetes in Mexican families. En: Journal of the Pancreas. Mayo 2005, Vol. 6 no. 3, p. 238–245.

¹²³ REGINA, Moises; REIS, Andre, y MOREL, Valerie. Prevalence of Maturity-Onset Diabetes of the Young Mutations in Brazilian Families With Autosomal-Dominant Early-Onset Type 2 Diabetes. En: Diabetes Care. 2001, Vol. 24 no. 4., p. 786–797.

¹²⁴ FURUZAWA, Gilberto, et al. Low prevalence of MODY2 and MODY3 mutations in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype. En: Diabetes Research and Clinical Practice. Junio, 2008, Vol. 81, no. 3., p. 12–14.

¹²⁵ AFONSO, Paula, et al. Maturity onset diabetes of young type 2 due to a novel de novo GCK mutation. En: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. Noviembre, 2014, Vol. 58 no. 7., p. 772–775.

¹²⁶ DELLAMANNA, Thais, et al. Clinical follow-up of two Brazilian subjects with glucokinase-MODY (MODY2) with description of a novel mutation. En: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. Septiembre, 2012, Vol. 56 no. 8., p. 490–495.

¹²⁷ WEINERT, Leticia, et al. Three unreported glucokinase (GCK) missense mutations detected in the screening of thirty-two Brazilian kindreds for GCK and HNF1A-MODY. En: Diabetes Research and Clinical Practice. 2014, Vol. 106 no. 2., p. 44–48.

¹²⁸ MOTA, Adolfo; BRÜGGEMANN, Simone, y COSTA, Fabricio. MODY 2: Mutation identification and molecular ancestry in a Brazilian family. En: Gene. 2013, Vol. 512, no. 2., p. 486–491.

¹²⁹ GIUFFRIDA, Fernando, et al. A novel glucokinase deletion (p.Lys32del) and five previously described mutations co-segregate with the phenotype of mild familial hyperglycaemia (MODY2) in Brazilian families. En: Diabetes Research and Clinical Practice. Enero, 2013, Vol. 100, no. 2., p. 2–5.

¹³⁰ BONATTO, Naieli, et al. Variants of the HNF1A gene: A molecular approach concerning diabetic patients from southern Brazil. En: Genetics and Molecular Biology. Julio, 2012, Vol. 35 no. 4., p. 737–740.

¹³¹ AGUILAR-SALINAS, Carlos, et al. Early-onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the mexican population. En: The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Octubre, 2001, Vol. 86 no. 1., p. 220–226.

¹³² DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, Op. Cit, 238–245.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Población de estudio

La población de estudio fue captada durante el transcurso del proyecto principal en cuyos datos y muestras está basado el presente trabajo. Este proceso tuvo una duración de 18 meses, periodo durante el cual se llamaron los pacientes, se realizaron consultas médicas, se registraron datos de la historia clínica y se autorizó la toma de muestras de sangre. El proyecto principal se titula “**Análisis clínico y detección de mutaciones de los genes GCK y HNF1A en pacientes con diabetes mellitus tipo MODY en Santander-Colombia**”, y pertenece a la convocatoria de COLCIENCIAS No. 657-2014 para proyectos de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud (Código COLCIENCIAS: 110265741650). Este contó con el aval del Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander CEINCI-UIS (Acta No. 13 del 30 de mayo de 2014).

Los pacientes fueron llamados a través de consultas de endocrinología pediátrica, genética clínica, endocrinologías del adulto y medicina interna llevadas a cabo en cuatro centros de atención en salud de la ciudad de Bucaramanga. Estos fueron el Hospital Universitario de Santander (HUS), la Clínica Materno Infantil San Luis (CSL), la Fundación Santandereana de Diabetes y Obesidad (FUSANDE) y la Caja de previsión social de la Universidad Industrial de Santander (CAPRUIS). Los sujetos participantes fueron citados en la Universidad Industrial de Santander en donde se llevó a cabo el registro de los datos de su historia clínica (ANEXO 3) y la toma de muestras de sangre, previa autorización a través del consentimiento y asentimiento informado (ANEXOS 1 y 2). Participaron individuos con una edad mínima de 3 años y máxima de 47 con promedio de edad de 17 años de edad. La toma de muestras de sangre se realizó mediante punción venosa del brazo,

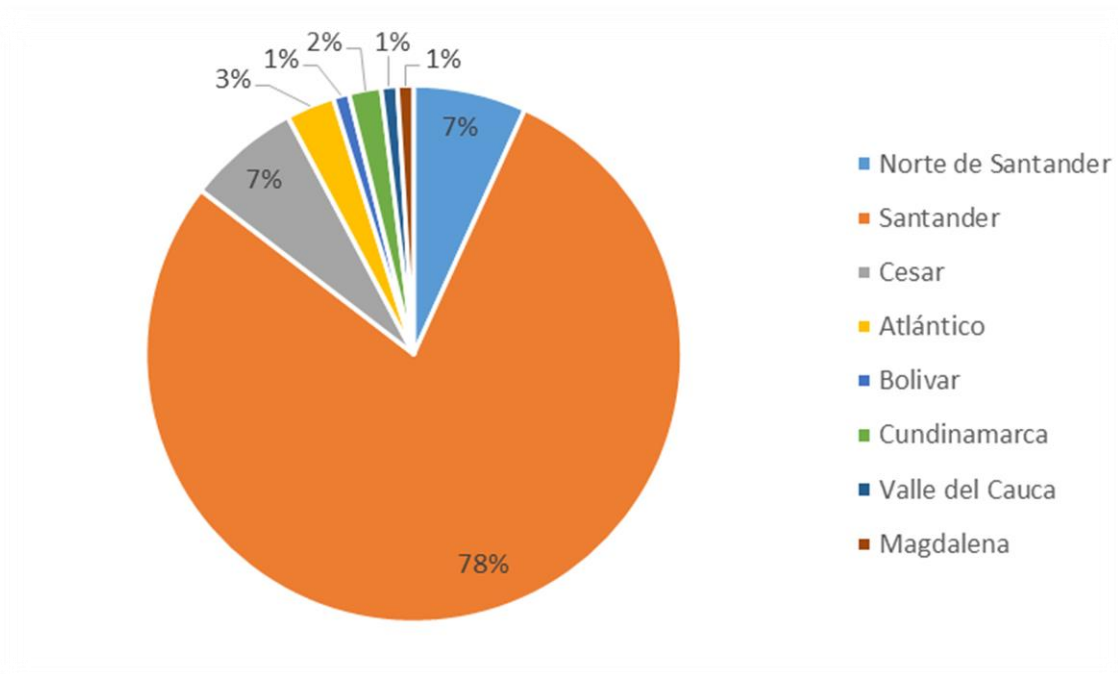
recolectando un tubo de sangre para ensayo de ELISA de detección de auto-anticuerpos y un segundo tubo y dos manchas de sangre para extracción de ADN.

La población de estudio es de procedencia colombiana, la mayoría de municipios localizados en el departamento de Santander (78%) (Fig. 1). Los sujetos participantes en el estudio fueron captados en base al cumplimiento de los siguientes criterios de inclusión:

1. Diagnósticos de DM1, DM2 o DM tipo MODY concordante con los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association-ADA)¹³³.
2. Diagnóstico de DM recibido entre los 2 y 30 años de edad.

¹³³ AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. En: Diabetes Care. Enero, 2014, Vol. 38 no. 2., p. 81–90.

Figura 1. Valores porcentuales de la procedencia de los pacientes por departamental.



3.2. Metodología de análisis

El proyecto “**Detección de Mutaciones en el Gen *HNF1A* en una Población de Pacientes con Sospecha Diagnóstica de *Diabetes Mellitus* Tipo MODY en Santander (Colombia)**” cuyos resultados se muestran en este documento está basado en muestras de sangre e información de datos clínicos a la cual se tuvo acceso que fue obtenida en el proyecto principal (ANEXOS 4 y 5). Estos datos incluyeron información tanto de variables cuyas mediciones fueron realizadas en el transcurso de ese proyecto (péptido C, autoanticuerpos GAD e IA2), como de variables cuyas mediciones fueron consultadas en las historias clínicas de los sujetos participantes. Dentro de las que fueron consultadas se incluyen paraclínicos como el perfil lipídico (Colesterol total, HDL, LDL, VLDL y triglicéridos), la glucemia basal y el análisis de orina para la detección de glucosa, los cuales son realizados

rutinariamente en pacientes con *diabetes mellitus*. El nivel de péptido C y la positividad para los autoanticuerpos anti-pancreáticos GAD/IA2 fueron medidos mediante las técnicas de ELISA no competitivo; empleando el kit “C-Peptide AccuBind ELISA Microwells 2725-300”, de Monobind Inc, USA para la medición del péptido C (valores de referencia 0,7 -1,9 ng/ml) y el kit EA 1022-9601-1G Euroimmun® para la medición simultánea de GAD e IA2 (positividad > 4,0 UI/ml). Tanto el proyecto principal como ese estudio contaron con la aprobación de CEINCI-UIS (Acta No. 16 del 14 de julio de 2017). En este estudio se llevaron a cabo metodologías como el diseño de primers, aislamiento de la capa leucocitaria, extracción de ADN, PCR y validación del amplificado por electroforesis en gel de agarosa. El paso final de este trabajo fue la secuenciación Sanger.

El diseño de primers se realizó con primer3 y primer3plus¹³⁴. Se obtuvo la secuencia de referencia de *HNF1A* en NCBI, la cual fue empleada para delimitar las secuencias de interés (exones 2 al 7) utilizando “BLAST 2 sequences” de BLAST¹³⁵ para establecer o confirmar los puntos de inicio y finalización de los exones. Se corrieron los programas de diseño de primers tomando 0, 10, 20, 30, 40 y 50 nucleótidos flanqueando las secuencias de interés, para generar por cada secuencia un total de 30 pares de primers candidatos. Las secuencias candidatas se sometieron a pruebas bioinformáticas para evaluar la estabilidad de estructuras secundarias tales como horquillas, auto-dímeros y heterodímeros. Esto se hizo en cada par de primers con UNAFOLD y Autodimer pues estas estructuras interfieren negativamente con la PCR y la secuenciación. Los pares de primers que se seleccionaban no solían formar estructuras secundarias, y las que formaban presentaban un bajo puntaje de estabilidad (se considera estable un puntaje < -10 en

¹³⁴ ROZEN, Steve, y SKALETSKY, Helen. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers [En línea]. Clifton, N.J.: Methods in Molecular Biology, 132, 365–386. 2000. (Recuperado en 3 de marzo de 2017) Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547847>

¹³⁵ MADDEN, Tom. Chapter 16 : The BLAST Sequence Analysis Tool. In The NCBI Handbook [En línea]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). 2002. (Recuperado el 12 de octubre de 2018) Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>

UNAFOLD y un $\Delta G > 0$ en Autodimer)^{136, 137}. Los resultados se contrastaron con los puntajes SELF y ANY de Primer3 que miden la estabilidad de algunas estructuras. Las secuencias de los pares de primer con los mejores parámetros fueron evaluadas para la presencia de SNPs en su secuencia a través de la interfaz gráfica del genoma humano de NCBI¹³⁸, base de datos dbSNP. Se seleccionaron las secuencias que reportaron menor número de SNPs. Esto se hizo para disminuir la probabilidad de que la variabilidad natural en la muestra interfiriera con la hibridación durante la PCR, modificando los parámetros calculados en los softwares. Los primers se diseñaron sobre secuencias con cero reportes de SNPs, o con posiciones degeneradas para las regiones en las que la presencia de SNP resultó inevitables (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de primers utilizados en el estudio, se utiliza la nomenclatura IUPAC para representar las posiciones degeneradas o variables (Tabla 2).

Tamaño Amplicon (pb)	Primers seleccionados	Región
395	CYTCAGRGTGACAAGGTTC TGTGTAATGGGGAKGGTGAA	Exón 2
400	AGAATCAAGGGCAAGGTCAG GCCAGGCTAAGCCAATATCA	Exón 3
480	CAGATCTGCCAGCCTCAAAC CATGAATGGAATGGAACCAA	Exón 4
297	AGTGCTGAGGGMTGTGGA AGGACTGCTCCAGAATCTC	Exón 5

¹³⁶ VALLONE, Peter, y BUTLER, John. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. En: BioTechniques. 2004, Vol. 37., p. 226–231.

¹³⁷ OWCZARZY, Richard, et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. En: Nucleic Acids Research. 2008, Vol. 36, p. 163-9.

¹³⁸ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: Nucleic Acids Research. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

Tamaño Amplicon (pb)	Primers seleccionados	Región
379	CCCAACCTCATCTTYYCTTG GCTCTTCCAGCTCCTGGATT	Exón 6
397	CTCTGGGAAGGAGAGGTGGT GTCCCAGAGACACATGCAGA	Exón 7

Tabla 2. Nomenclatura IUPAC para representar posiciones degeneradas o variables en una secuencia de ADN o ARN.

Código IUPAC nucleótido	Base
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T (o U)	Timina (o uracilo)
R	A o G
Y	C o T
S	G o C
W	A o T
K	G o T
M	A o C
B	C o G o T
D	A o G o T
H	A o C o T
V	A o C o G
N	Cualquier nucleótido
. o -	Gap

Se realizó el aislamiento de la capa leucocitaria mediante doble centrifugación. Las condiciones de esta fueron de 2500 rpm por 10 minutos. El procedimiento consiste en la centrifugación y pipeteo del tubo de ensayo que contiene la muestra de sangre. Durante la centrifugación la sangre total es separada en tres fases; un precipitado rojo (fase de eritrocitos), la fase del medio blanquecina (capa leucocitaria) y el sobrenadante de apariencia amarillenta correspondiente al plasma sanguíneo. En el pipeteo se toma la capa del medio descartando el sobrenadante y con cuidado extrayendo la fase blancuzca poco a poco, el procedimiento se repite una vez.

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el protocolo de extracción de fenol-cloroformo descrito en la literatura¹³⁹. Brevemente se suspende la muestra en 500 µl de buffer DLB, se añaden 50 µl de 10% SDS y 5 µl de proteinasa K y se deja incubar la mezcla 12 horas a 56°C en baño de maría con agitación suave. Luego de darle un spin al lisado celular resultante se le añaden 20 µl de 5M NaCl, 287.5 µl de fenol y 287.5 µl de 24:1 cloroformo-álcool isoamílico, mezclando por inversión y centrifugando a 1200 rpm por 3 minutos. Posteriormente se pasa la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo con una punta recortada para facilitar el proceso, se añaden 575 µl de 24:1 cloroformo-álcool isoamílico y se mezcla por inversión. De nuevo se centrifuga a 1200 rpm por 3 minutos y se extrae la fase superior en un tubo nuevo, a esta mezcla se le agrega 1 ml de 96% etanol y se deja 15 minutos a -20°C. Después del proceso se descarta con cuidado el líquido del tubo sin tocar el tapón de ADN y se deja secar. Finalmente se agregan 100 µl de buffer TE al tapón y se deja en baño de maría a 56 °C entre 12 y 16 horas.

El aislamiento y amplificación de cada uno de los fragmentos de interés se llevó a cabo mediante PCR. Las condiciones de la PCR para los exones 2, 3, 4, 6 y 7 de *HNF1A* fueron: un primer periodo de 95°C por 2 min, 35 ciclos de denaturación

¹³⁹ MANIATIS, Tom; FRITSCH, Edward, y SAMBROOK, Joseph. Molecular cloning. A Laboratory Manual. S. L.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. p. 1246-1789. ISBN 087969 1360.

(94°C-30s), hibridación (60°C-90s) y extensión (72°C-90s), y un periodo de extensión de 72°C por 10 minutos. Lo anterior se llevó a cabo con el kit QIAGEN Multiplex PCR. Las condiciones de la PCR para el exón 5 fueron distintas. Brevemente un periodo de 95°C por 2 min, 35 ciclos de denaturación (95°C-60s), hibridación (63.1°C-60s) y extensión (72°C-60s), y un periodo de extensión de 72°C por 5 minutos. En ambos casos las muestras se mantuvieron en un periodo final indefinido denominado de re-hidratación a 4°C, durante el cual se recogían los amplificadores del termociclador.

Estos amplificadores fueron validados mediante electroforesis en gel de agarosa (2%). Este procedimiento se realizó con gel de agarosa (preparación con buffer TBE). La agarosa era pesada y añadida a un volumen de buffer TBE y se dejaba calentando la mezcla en plancha con agitación hasta obtener un líquido caliente transparente de baja viscosidad. Durante esta preparación se añadía bromuro de etidio a la mezcla. El líquido era vertido sobre el molde del gel y sobre este se colocaban los peines, esperando aproximadamente 30 minutos hasta su solidificación. Se retiraban los peines con cuidado formando pozos y se sumergía el gel en buffer de corrida. A cada pozo se le agregaba buffer de carga y un volumen de la muestra, control, o marcador de peso, dependiendo de lo que se quisiera visualizar en el pozo. Las muestras eran cargadas hasta llenar todos los pozos, y se efectuaba la corrida encendiendo la fuente de poder a 70 voltios de 45 a 60 minutos. El gel se visualizaba en el cuarto oscuro por medio de un transiluminador evaluando la calidad y presencia del amplificado. Amplificadores con buena calidad mostraron una sola banda luminosa coincidente con el peso molecular esperado del amplicón (Figs. 2-7). Por el contrario, aquellos de mala calidad no generaron bandas (muestra 0083 Fig. 2 exón 2) o generan dobles bandas (Fig. 8).

Figura 2. Gel del exón 2 con algunas muestras en el transiluminador; (-): control negativo.

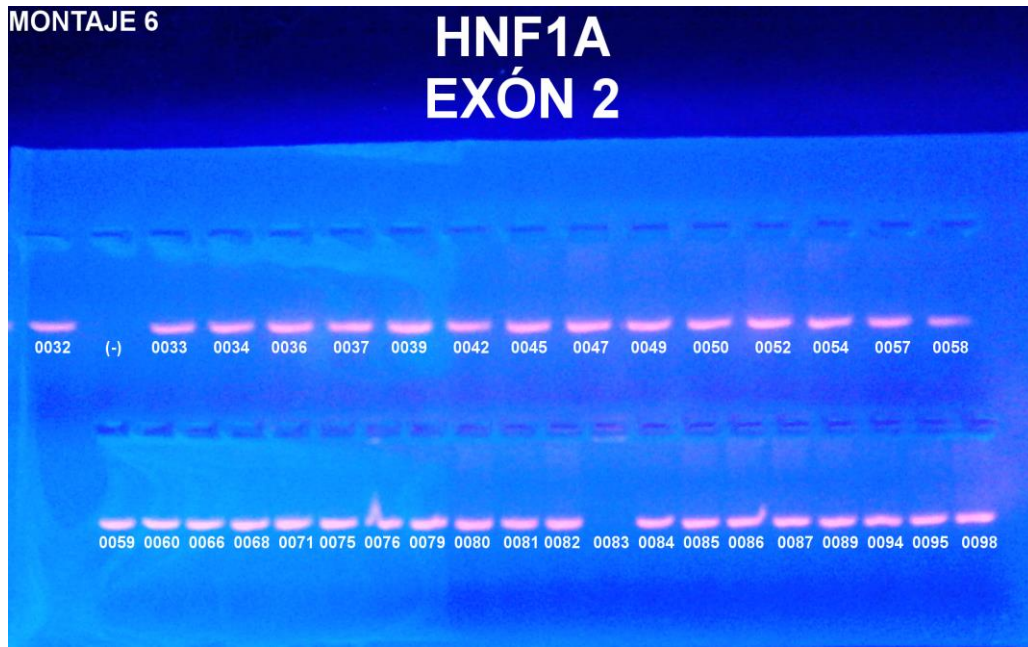


Figura 3. Gel del exón 3 con algunas muestras en el transiluminador

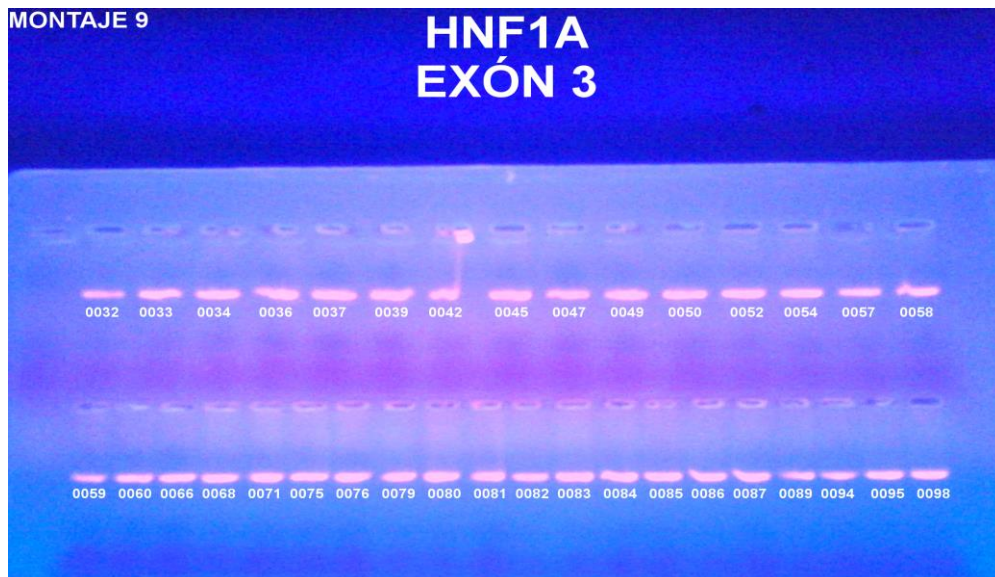


Figura 4. Gel del exón 4 con algunas muestras en el transiluminador; (-): control negativo.

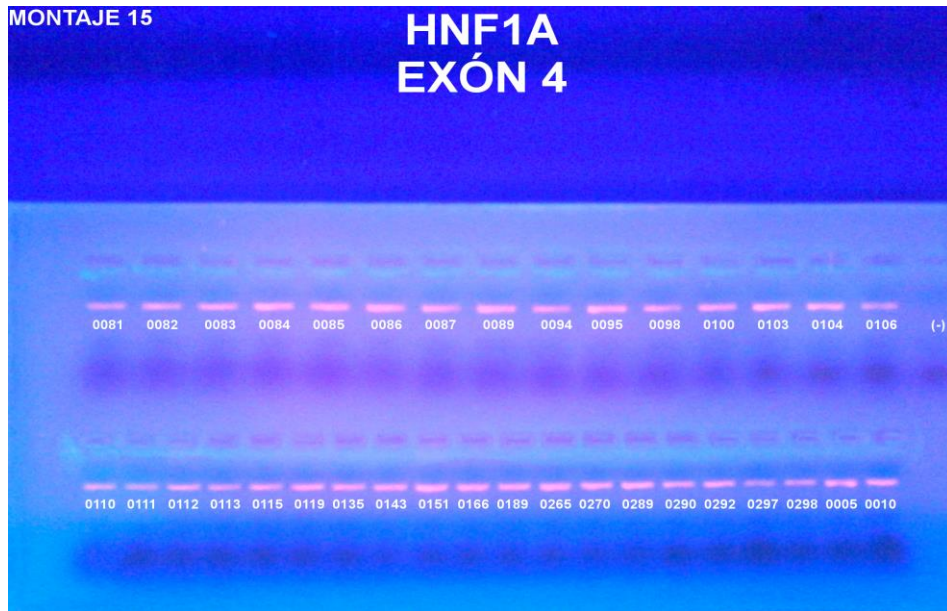


Figura 5. Gel del exón 5 con algunas muestras en el transiluminador; (-): control negativo.

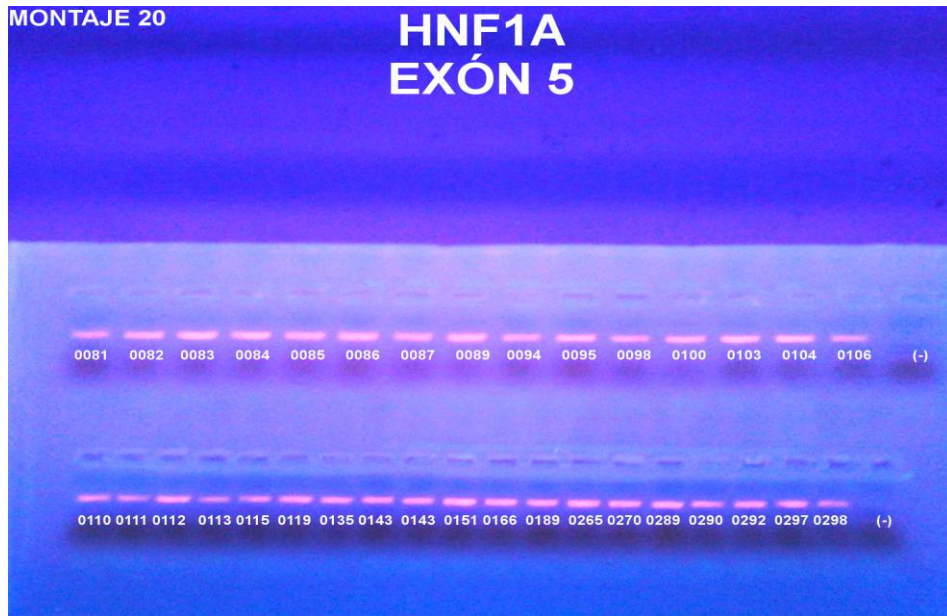


Figura 6. Gel del exón 6 con algunas muestras en el transiluminador; (-): control negativo

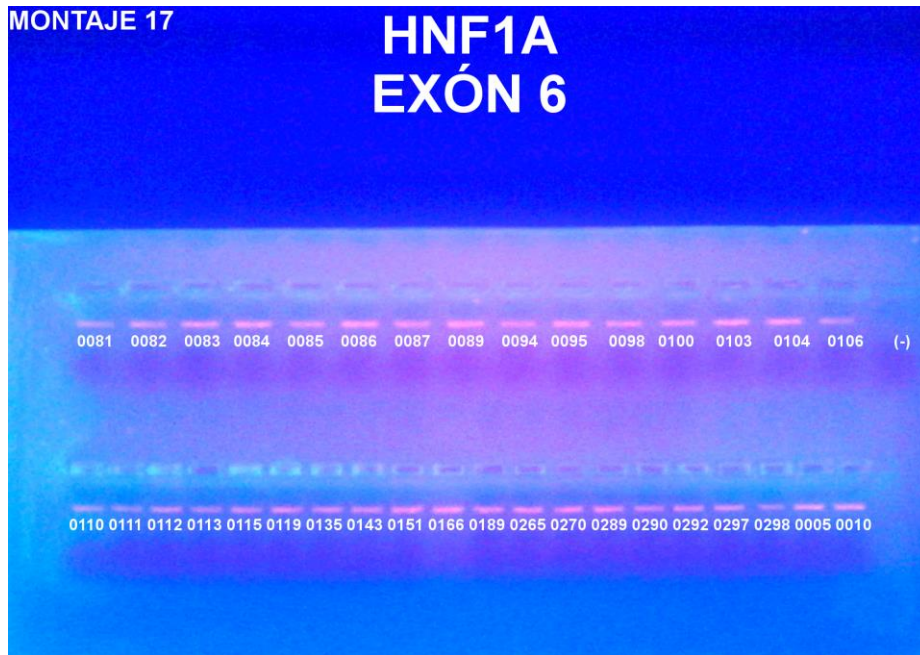


Figura 7. Gel del exón 7 con algunas muestras en el transiluminador; (-): control negativo, (+): control positivo

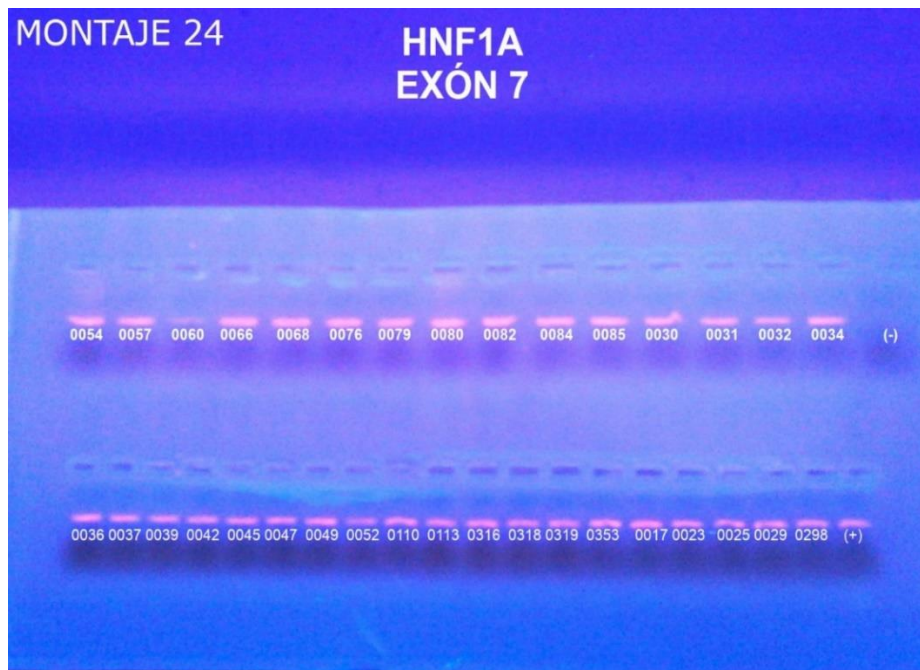
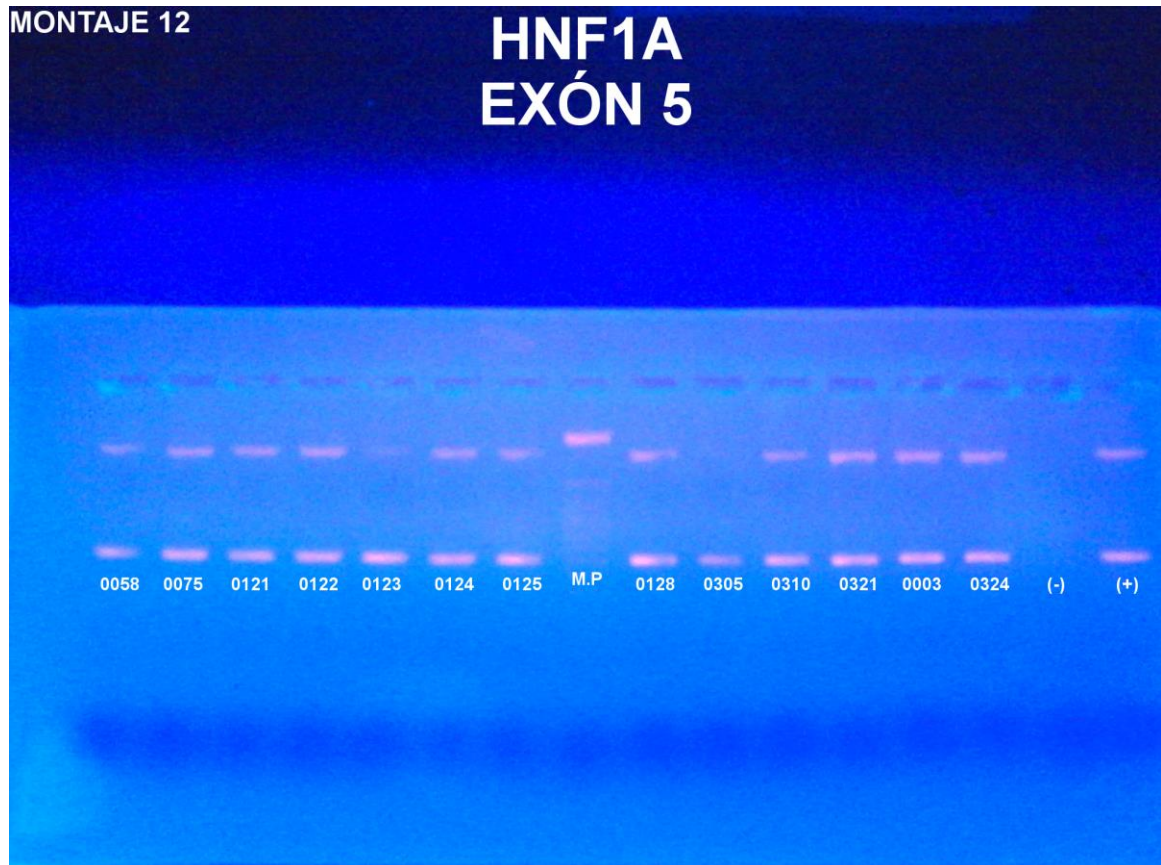


Figura 8. Gel del exón 5 con algunas muestras en el transiluminador evidencia de amplificación inespecífica; (-): control negativo, (+): control positivo, M.P: marcador de peso molecular.



Se enviaron a secuenciación un total de 624 amplificados de un total de 104 pacientes. Todos estos fueron validados en calidad y presencia de amplificado. El tipo de secuenciación elegido fue sanger, las muestras fueron purificadas por el mismo laboratorio que efectuó la secuenciación. Los resultados (datos de secuencia) llegaron al laboratorio en archivos AB1 identificados con el código del paciente y el fragmento amplificado. Al llegar estos completos (para todos los pacientes y fragmentos), comenzó la fase analítica en la cual se identificaron y clasificaron las variantes de acuerdo a su patogenicidad.

Se utilizó Codoncode Aligner para la identificación de variantes, este programa incorpora el software PHRED el cual permite distinguir automáticamente las bases verdaderas del ruido de fondo y artefactos de técnica¹⁴⁰. La secuencia genómica de *HNF1A* NG_011731 se utilizó como referencia para el alineamiento y trimming (recorte de secuencia) previos a la identificación de las variantes. Durante el proceso de trimming o recorte de secuencias, estas se alinearon con la referencia y fueron recortadas para eliminar pedazos de baja calidad. Una vez se alineaban las secuencias recortadas se realizaba la identificación de variantes. Brevemente se utilizó la función de búsqueda de mutaciones de CodonCode Aligner para generar una lista de mutaciones las cuales se verificaban visualmente en los electroferogramas de cada paciente. Todas las secuencias de interés biológico de *HNF1A* tales como exones, intrones, marcos abiertos de lectura (Open Reading Frames; ORFs), secuencias conservadas aceptoras y donadoras del empalme, codones e isoformas, fueron mapeadas y localizadas en la secuencia de referencia. Esto permitió verificar y evaluar los posibles efectos de cada variante dependiendo las secuencias de importancia biológica que se encontraban afectadas.

Se utilizaron las bases de datos HGMD¹⁴¹, 1000G¹⁴², NHLBI-ESP (National Heart, Lung, and Blood Institute-Exome Sequencing Project)¹⁴³, ExAC (ExAC; Exome Aggregation Consortium), dbSNP¹⁴⁴, ENSEMBL¹⁴⁵, ClinVar¹⁴⁶ y Base de Datos de

¹⁴⁰ EWING, Brent, et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using. En: Genome Research. 2005, Vol. 206., p. 175–185.

¹⁴¹ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: Genome Medicine. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

¹⁴² THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. En: Nature. Enero, 2015, Vol. 526 no. 7571., p. 68–74.

¹⁴³ SAN LUCAS, Anthony, et al. Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. En: Bioinformatics. 2012, Vol. 28 no. 3., p. 421–422.

¹⁴⁴ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: Nucleic Acids Research. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

¹⁴⁵ ZERBINO, Daniel, et al. (2018). Ensembl [En línea]. S. L.: Nucleic Acids Research. 2018. (Recuperado el 25 de octubre de 2018) Disponible en <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1098>

¹⁴⁶ LANDRUM, Melissa, et al. ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. En: Nucleic Acids Research. 2014, Vol. 42 no. 1, p. 980–985.

la Variación Abierta de Leiden (LOVD; Leiden Open Variation Database)¹⁴⁷ para evaluar reportes previos y encontrar datos de anotación . Se utilizó Mutation taster¹⁴⁸ para analizar el grado de conservación del aminoácido cambiado en el caso de mutaciones no sinónimas y clasificar las variantes de acuerdo con sus efectos en la proteína (sinónimas, no sinónimas, isoformas). Lo anterior fue confirmado evaluando la localización de los elementos de importancia genómica mapeados previamente, tales como exones, codones y secuencias conservadas importantes para las funciones de corte y empalme. Las variantes con efectos no sinónimos fueron evaluadas con Polyphen2¹⁴⁹¹⁵⁰, PROVEAN¹⁵¹ y SIFT¹⁵².

La evaluación de patogenicidad de las variantes encontradas se llevó a cabo empleando los criterios del Colegio Americano de Genética Médica (ACMG; American College of Medical Genetics) descrito en detalle en la literatura¹⁵³, y de la guía de Buenas Prácticas para el diagnóstico Genético-Molecular de la DM MODY¹⁵⁴ (Tabla 3). El análisis del fenotipo clínico y su relación con las variantes, se llevó a cabo comparando pacientes con el genotipo y sin el genotipo. Esta comparación se hizo directa entre dato y dato cuando los datos no fueron suficientes para efectuar los análisis estadísticos descriptivos. En el caso contrario, de datos

¹⁴⁷ FOKKEMA, Ivo, et al. LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. En: Human Mutation. Diciembre, 2011, Vol. 32 no. 5., p. 557–563.

¹⁴⁸ SCHWARZ, Jana Marie, et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. En: Nature Methods. 2014, Vol. 11 no. 4., p. 361–362.

¹⁴⁹ ADZHUBEI, Ivan; JORDAN, Daniel y SUNYAEV, Shamil. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. En: Current Protocols in Human Genetics. Enero, 2013, Vol. 76 no. 1., p. 69-87.

¹⁵⁰ CHOI, Yongwook, y CHAN, Agnes. PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. En: Bioinformatics. Marzo, 2015, Vol. 31 no. 16., p. 2745–2747.

¹⁵¹ *Ibíd*, p 2745- 2747.

¹⁵² SIM, Ngak-Leng, et al. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. En: Nucleic Acids Research. 2012, Vol. 40, No. 1., p. 452–457.

¹⁵³ RICHARDS, Sue, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. En: Genetics in Medicine. 2015, Vol. 17, No. 5, p. 405–424.

¹⁵⁴ ELLARD, Sian; BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, y HATTERSLEY, Andrew. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. En: Diabetologia. Enero, 2008, Vol. 51 no. 4., p. 546–553.

más abundantes se realizó la estimación de intervalos de confianza al 90% para el promedio en variables cuantitativas y para la proporción en variables cualitativas de interés biológico y genético.

Tabla 3. Criterios de clasificación de patogenicidad de variantes de la guía de Buenas Prácticas para el diagnóstico Genético-Molecular de la DM MODY (BPGM). Los criterios solo aplican en probandos afectados; niños y adultos jóvenes con diagnóstico de DM e historia familiar de DM que se someten a pruebas genético-moleculares de DM MODY (secuenciación)

Clasificación	Criterios	Observaciones
Patogénica (P)	Mutaciones nuevas: sin sentido, corrimiento del marco de lectura, disrupción del sitio conservado de corte-empalme. Mutaciones de sentido erróneo reportadas previamente en asociación con DM MODY	Resultado confirma diagnóstico de DM MODY
Probablemente Patogénica (PP)	Mutaciones de sentido erróneo nunca antes reportadas, ausentes en por lo menos 210 controles étnicamente equivalentes y/o con predicciones de ser patogénica (SIFT, Polyphen2.	Resultado consistente con diagnóstico de DM MODY
Probablemente NO Patogénica (PNP)	Poca evidencia que apoye la patogenicidad de la variante	Resultado no confirma diagnóstico de DM MODY

4. RESULTADOS

La población de estudio presentó una edad mínima de diagnóstico de 2 años y máxima de 14 años, para los tres diagnósticos incluidos; DM1, DM2 o DM MODY. Las características clínicas de esta población son descritas en la tabla 4, la edad de los participantes mostró diferencias significativas porque los individuos con DM2 presentaron mayor edad que el resto, pero esto no influyó en el estudio ya que el criterio de inclusión elegido fue la edad de diagnóstico. La DM2 presentó diferencias significativas en variables como el IMC, en promedio mayor que el de la DM1 (Holm-Sidak critical point; 0.017) o el de la DM tipo MODY (Holm-Sidak critical point; 0.025), así mismo el porcentaje de individuos con obesidad, el nivel de colesterol total, y nivel de triglicéridos se encontraron significativamente mayores en DM2. Los individuos con diagnóstico de DM tipo MODY mostraron diferencias del resto de la población en parámetros clínicos como la glucemia basal presentando diferencias significativas con la DM1 (Dunn's test; $P < 0.05$) o la hemoglobina glicosilada siendo significativamente menor en DM tipo MODY que en DM1 o DM2 (Dunn's test; $P < 0.05$). Variables como el nivel de péptido C, la herencia autosómica dominante, mostraron un valor significativamente menor en individuos con diagnóstico de DM1, contrario a lo observado en parámetros como la insulino-dependencia, porcentaje de eventos de cetosis/cetoacidosis, nivel de HDL y porcentaje de positividad para los autoanticuerpos GAD/IA2 los cuales presentaron mayores niveles en individuos con DM1.

Tabla 4. Características clínicas de la DM1, DM2 y la DM tipo MODY en la población de estudio.

	DM1 (n=76)	DM2 (n=8)	DM tipo MODY (n=20)	Valor P
Edad (años) ⁺	15.2 ± 9.2	40.7 ± 11.0	14.4 ± 6.7	≤ 0.001
Edad diagnóstico (años) ⁺	7.0 ± 3.6	9	8.9 ± 3.8	0.113
Sexo (masculino/femenino)	36/40	3/5	11/9	0.862
% Herencia autosómica dominante de <i>diabetes mellitus</i> *	54.7 (44.5- 64.5)	87.5 (52.9- 99.4)	89.5 (70.4-98.1)	0.007
% Antecedentes familiares de <i>diabetes mellitus</i> antes de los 30 años*	17.8 (10.9- 26.8)	14.3 (0.7-52.1)	42.1 (23.0-63.2)	0.066
% Insulino-dependencia*	98.7 (93.9- 99.9)	50.0 (19.3- 80.7)	10.0 (1.8-28.3)	<0.001
% Eventos de cetosis/cetoacidosis*	70.6 (66.5- 83.9)	0.0 (0.0-31.2)	5.0 (0.3-21.6)	<0.001
IMC (Kg/m ³) ⁺	19.3 ± 3.6	26.3 ± 3.1	20.2 ± 4,2	≤ 0.001
% Obesos*	1.7 (0.1-7.7)	20.0 (1.0-65.7)	0.0 (0.0-19.3)	0.035

	DM1 (n=76)	DM2 (n=8)	DM tipo MODY (n=20)	Valor P
Colesterol total ⁺	188.7 ± 48.8	211.1 ± 83.5	160.5 ± 32.0	0.034
HDL ⁺	66.4 ± 67.5	41.2 ± 11.0	52.4 ± 11.9	0.025
LDL ⁺	119.8 ± 41.7	115.3 ± 16.2	98.4 ± 27.4	0.177
VLDL ⁺	12.1 ± 4.5	44.7 ± 38.6	21.4 ± 13.3	0.137
Trigliceridos ⁺	94.6 ± 108.5	268.7 ± 191.1	91.3 ± 40.7	0.003
% Glucosuria [*]	79.7 (69.7- 87.5)	50.0 (19.3- 80.7)	5.6 (0.3-23.8)	<0.001
Glucemia basal (mg/dl) ⁺	465.0 ± 206.6	316.2 ± 145.6	161.0 ± 90.0	≤ 0.001
HbA1c (%) ⁺	8.7 ± 2.4	8.3 ± 1.6	6.0 ± 0.8	≤ 0.001
% Positividad para GAD/IA2 [*]	69.7 (59.9- 78.4)	0.0 (0.0-31.2)	0.0 (0.0-13.9)	<0.001
Péptido C (ng/ml) ⁺	0.39 ± 0.20	0.81 ± 0.45	0.67 ± 0.28	≤ 0.001

⁺Promedio ± desviación estándar.

^{*}Exacto (90% IC].

Se encontraron 5 variantes en la población de estudio; c.475C>T, c.481G>A, c.864G>C, c.1375C>T y c.1460G>A (Tabla 4; Figuras 9-11, 13, 14). c.864G>C y c.1375C>T son variantes silenciosas que no alteran la secuencia de aminoácidos. Por su parte c.475C>T, c.481G>A, y c.1460G>A ocasionan cambios de sentido en la secuencia de aminoácidos, de los cuales solo los de c.1460 G>A evidencian baja probabilidad de patogenicidad de acuerdo con Polyphen2, PROVEAN y SIFT ¹⁵⁵, ¹⁵⁶ (Tabla 5). Ninguna de las variantes identificadas en el estudio afectó las secuencias conservadas de sitios aceptores o dadores del límite intrón-exón mapeadas en *HNF1A*.

Tabla 5. Localización de las variantes identificadas en el estudio en diferentes formatos. Variante: posición en NG_011731; E: exón; ARN: posición en NM_001306179 y NM_000545; ORF: posición en la secuencia codificante de NM_001306179.1 y NM_000545.6; Cod: posición en el codón de NP_001293108 y NP_000536; GRCh38: coordenadas cromosómicas de la variante en el cromosoma 12 formato de human Genome Reference Consortium (constructo 38); NCBI: coordenadas cromosómicas de la variante en el cromosoma 12; dbSNP: código identificación SNP de referencia en dbSNP

Variante	E	ARN	ORF	Codón	GRCh38	dbSNP
<i>g.15236</i> C>T	2	r.676 C>T	c.475 C>T	159	120988981	rs765432081
<i>g.15242</i> G>A	2	r.682 G>A	c.481 G>A	161	120988987	rs201095611
<i>g.20569</i> G>C	4	r.1065 G>C	c.864 G>C	288	120994314	rs56348580

¹⁵⁵ ADZHUBEI, Ivan; JORDAN, Daniel y SUNYAEV, Shamil. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. En: Current Protocols in Human Genetics. Enero, 2013, Vol. 76 no. 1., p. 69-87.

¹⁵⁶ SIM, Ngak-Leng, et al. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. En: Nucleic Acids Research. 2012, Vol. 40, No. 1., p. 452–457.

Variante	E	ARN	ORF	Codón	GRCh38	dbSNP
<i>g.23794</i>	7	r.1576	c.1375	459	120997539	rs2259820
<i>C>T</i>		<i>C>T</i>	<i>C>T</i>			
<i>g.23879</i>	7	r.1661	c.1460	487	120997624	rs2464196
<i>G>A</i>		<i>G>A</i>	<i>G>A</i>			

Tabla 6. Variantes no sinónimas que causan cambios de sentido en la secuencia de aminoácidos (mutaciones de sentido erróneo). Se muestra el cambio producido y el resultado del análisis con Polyphen2, PROVEAN y SIFT. PD: Probably Damaging.

Variante	Cambio proteína	Polyphen2	PROVEAN	SIFT
c.475 C>T	p.(Arg159Trp)	PD	-7.489 (Deleterious)	0 (Damaging)
c.481 G>A	p.(Ala161Thr)	PD	-2.694 (Deleterious)	0.03 (Damaging)
c.1460 G>A	p.(Ser487Asn)	Benign	-0.610 (Neutral)	0.37 (Tolerated)

Las variantes identificadas en este trabajo han sido previamente reportadas en otros estudios y presentan código de referencia en dbSNP y ENSEMBL^{157, 158}. En HGMD c.475C>T y c.481G>A aparecen asociadas a DM MODY, mientras que c.864G>C se asocia con DM2 y c.1460G>A con riesgo cardiovascular¹⁵⁹. En bases de datos que aportan datos de frecuencia en distintas poblaciones c.481G>A, c.864G>C,

¹⁵⁷ GEER, Lewis, et al. The NCBI BioSystems database. En: Nucleic Acids Research. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

¹⁵⁸ ZERBINO, Daniel, et al. (2018). Ensembl [En línea]. S. L.: Nucleic Acids Research. 2018. (Recuperado el 25 de octubre de 2018) Disponible en <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1098>

¹⁵⁹ STENSON, Peter, et al. HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: Genome Medicine. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

c.1375C>T y c.1460G>A se reportan con distinta frecuencia, siendo c.481G>A la de menor frecuencia tanto en este estudio como en las bases de datos (Tabla 6). La variante c.475C>T no aparece en ninguna población, esta presenta una frecuencia de 0.005 (0.000-0.023) en la población de estudio. La variante c.864 G>C presenta una frecuencia muy variable, la frecuencia hallada en este estudio es menor a la esperada en poblaciones étnicamente equivalentes.

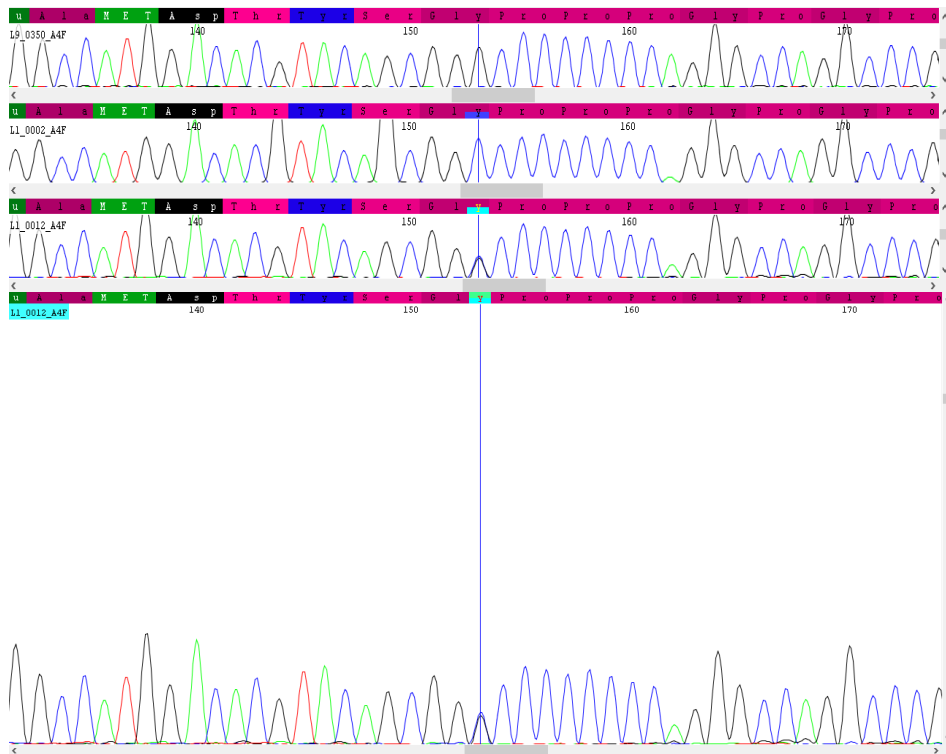
Tabla 7. Frecuencia de las variantes en diferentes bases de datos comparada a la hallada en la población de estudio. Observada: población de estudio, ExAc Latino: población de origen latino ExAc, 1000G AMR: población de origen americano 1000G, ExAc: población mundial ExAc, 1000G: población mundial 1000G, LOVD: Leiden Open Variation Database, NHLBI-ESP: National Heart, Lung, and Blood Institute-Exome Sequencing Project.

	c.481G>A	c.864 G>C	c.1375 C>T	c.1460 G>A
Observada	0.005	0.260	0.337	0.332
IC 90%	(0.000-0.023)	(0.210-0.314)	(0.282-0.394)	(0.278-0.389)
ExAc Latino	0	0.4862	0.3786	0.3897
1000G AMR	0	0.4150	0.3501	0.3501
ExAc	0.0001	0.2788	0.3368	0.3465
1000G	0	0.1811	0.3167	0.3177
LOVD	0	0.3350	0.2690	0.2690
NHLBI-ESP	<0.0001	0.3085	0.3269	0.3286

La variante c.864G>C se encontró en 65 pacientes. Esta cambia el tercer nucleótido del codón de glicina 1 (GGG) por una C (GGC) generando un cambio silencioso (Figura 9). Las características clínicas de los sujetos con la variante no difieren significativamente de las de los sujetos sin esta. La frecuencia alélica de esta variante no es tan baja como para considerarse rara (Tabla 6), y es clasificada como

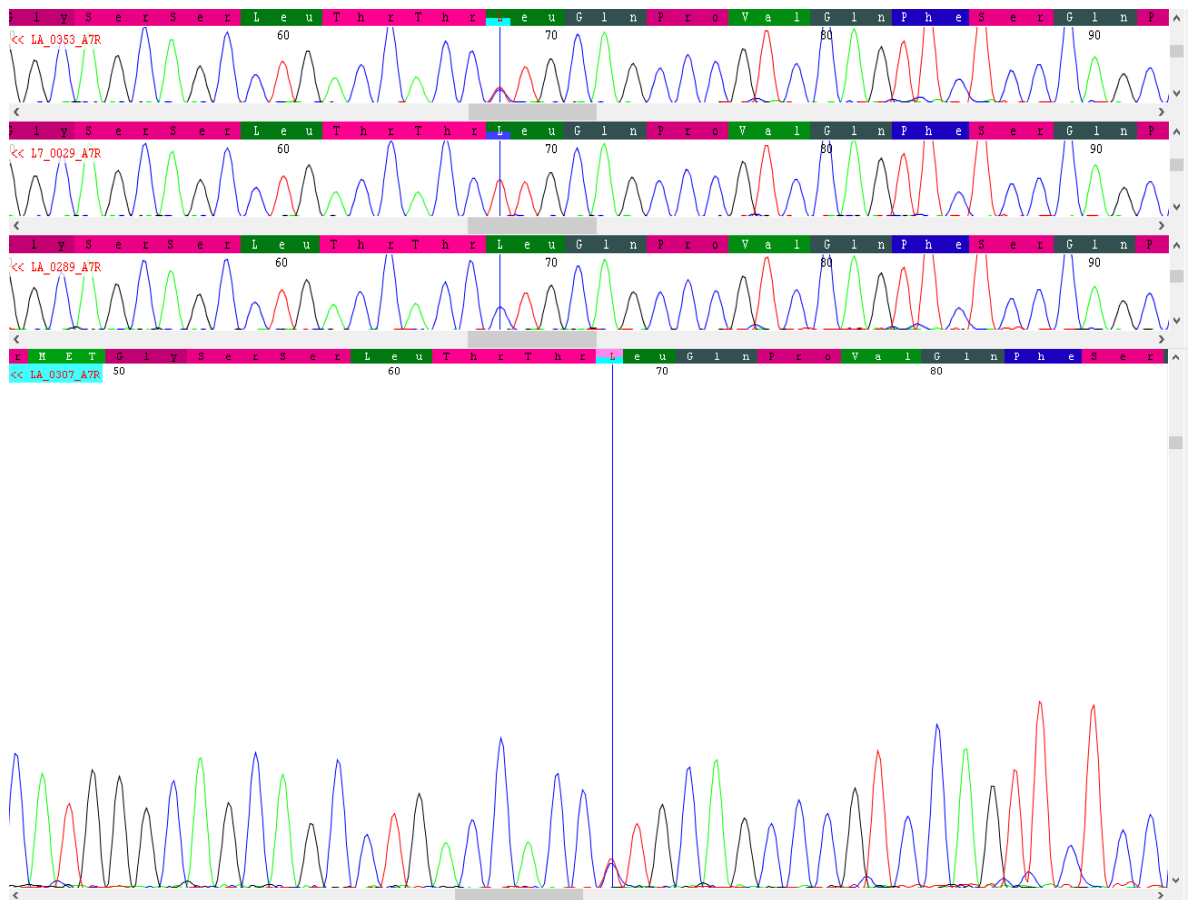
polimorfismo sin efecto biológico conocido debido a que se presenta en sujetos sanos y tiene muy baja probabilidad de patogenicidad (Tabla 7).

Figura 9. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.864 señalada en primer plano. Se observa un individuo homocigoto para el alelo G, un homocigoto para el alelo C y el heterocigoto para la variante c.864G>C en detalle.



La variante c.1375C>T afecta el primer nucleótido del codón de leucina de la posición 459, el cambio generado es sinónimo (CTG>TTG) y se considera silencioso (Figura 10). Las características clínicas de los 71 sujetos de estudio con la variante no difieren significativamente de los sujetos sin esta y al igual que la anterior se considera benigna y Probablemente No Patogénica (PNP) debido a que se presenta con frecuencia polimórfica en sujetos sanos y muestra baja probabilidad de patogenicidad (Tabla 7).

Figura 10. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.1375 señalada en primer plano. Se observa un heterocigoto para la variante c.1375C>T, un individuo homocigoto para el alelo T, un homocigoto para el alelo C y otro heterocigoto para la variante c.1375C>T en detalle.



La variante c.1460G>A es clasificada como probablemente no patogénica, y cambia el codón 487 de serina (AGC) a asparagina (AAC) (Figura 11). Esta se encontró en el genotipo de 72 pacientes cuyas características clínicas no muestran diferencias significativas respecto los sujetos sin la variante. En el análisis de conservación el cambio generado se considera conservativo (Tabla 7; Figura 12), ya que el AA remplazante (asparagina) presenta condiciones fisicoquímicas muy semejantes a la

serina original. En el alineamiento de Mutation Taster se observa un reemplazo conservado de treonina en esta posición concordante con lo anterior, pues treonina, serina y asparagina son AA con residuos polares sin carga. Esta variante presenta una frecuencia considerable tanto en la población de estudio como en las bases de datos, observándose en condiciones de homocigosidad (Tabla 6). En algunas bases de datos se asocia esta variante a ciertas características clínicas como un nivel más alto de LDL. En este estudio se observa que el nivel medio de LDL en los pacientes con la variante (120.89) fue mayor que en los pacientes sin esta (112.171), pero las diferencias no fueron significativas. Esta variante se clasifica como benigna principalmente debido a la presencia de esta en sujetos sanos (Tabla 7).

Figura 11. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.1460 señalada en primer plano. Se observa un individuo homocigoto para el alelo A, un segundo homocigoto para el alelo G, y dos heterocigotos para la sustitución c.1460G>A uno de ellos mostrado en detalle

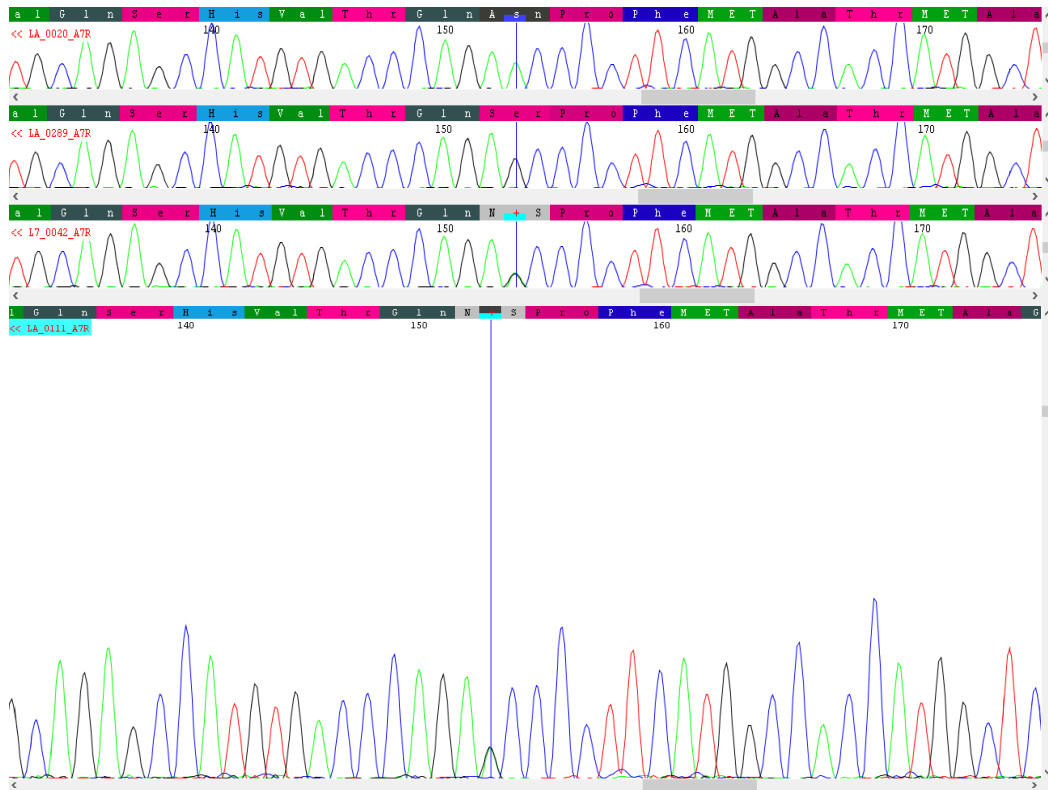


Figura 12. Análisis de conservación del cambio p.(Ser487Asn)

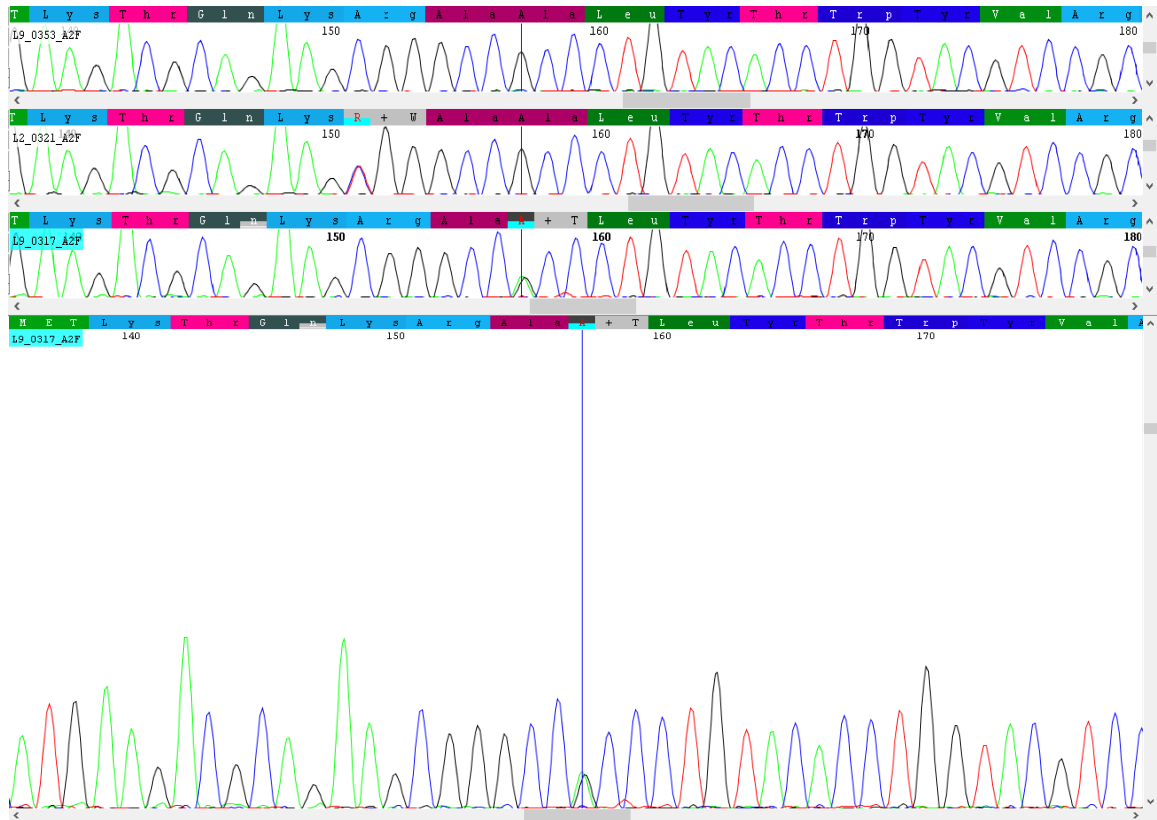
conservation protein level for non-synonymous changes	species	match	gene	aa	alignment
	Human			487	LMPVQSHVTQSPFMATHAQLQ SP
	mutated	all conserved		487	QSHVTQIPFMATHAQLQ S
	Ptrogodytes	all identical	ENSPTR0000005551	487	QSHVTQIPFMATHAQLQ S
	Mmulatta	no homologue			
	Fcatus	all identical	ENSFCAG0000009638	488	HQSHVAQIPFMATHAQLQ S
	Mmusculus	all identical	ENSMUSG00000029556	486	QSHVAQIPFMATHAQLQ S
	Ggallus	all identical	ENSGALG0000006968	491	LMQVQSHINQIPFMATHAQIQ N
	Trubripes	all identical	ENSTRUG00000016222	446	HMGSPFMATHAPLP C
	Drerio	all identical	ENSDFARG0000009470	437	SHIAPSPFMATHAQL -
	Dmelanogaster	no homologue			
	Celegans	all conserved	F54A5.1	237	LIRHLESFFTQIPFDLPRRVEIANA C
	Xtropicalis	no homologue			

La mutación c.481G>A tiene ocurrencia en el codón 161 GCC de alanina, el cual es reemplazado por un codón ACC de treonina (Figura 13). Esta alanina está en una

región altamente conservada lo que sugiere que su reemplazo podría indicar patogenicidad (Tabla 7). El efecto biológico de esta variante se considera deletéreo en la literatura ya que perturba la estabilidad de HNF1A¹⁶⁰. El único paciente afectado reporta las siguientes características clínicas; edad de diagnóstico de 10 años, sin herencia de DM de inicio juvenil, insulino dependiente, sin eventos de cetosis o cetoacidosis, glucemia basal de 455 mg/dl, IMC al momento del estudio de 17.35, péptido C de 0.48 ng/ml y positividad para GAD e IA2. Dichas características están más cercanas a un diagnóstico de DM1. La variante se considera patogénica de acuerdo con la clasificación BPGM debido a que se reporta previamente como patogénica con efectos deletéreos en diferentes simulaciones *in silico* (Tabla 5). La ausencia de esta variante en verdaderos casos y controles, así como la falta de estudios de segregación en familias dificulta que sea catalogada como patogénica al emplear criterios más estrictos (Tabla 7).

¹⁶⁰ CHI, Young, et al. Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1 α . En: Molecular Cell. Noviembre, 2002, Vol. 10 no. 5., p. 1129–1137.

Figura 13. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.481 señalada en primer plano. Se observan dos individuos homocigotos para el alelo G y el heterocigoto para la mutación c.481G>A en detalle.



La mutación c.475C>T afecta el primer nucleótido del codón de arginina (CGG) generando un codón de triptófano (TGG) (Figura 14). Este cambio se reporta en un solo paciente no insulino dependiente diagnosticado clínicamente con DM MODY. El sujeto afectado presenta las siguientes características; edad de diagnóstico de 12 años, herencia autosómica dominante de diabetes de inicio juvenil, sin eventos de cetosis o cetoacidosis, glucemia basal de 211 mg/dl, IMC de 22.6 al momento del estudio, HbA1c de 84%, péptido C normal de 1.08 (0.3-3.73), negatividad para auto-anticuerpos anti-pancreáticos y positividad para glucosuria. El efecto biológico de

esta variante es corromper las interacciones de la proteína con el ADN ¹⁶¹ lo cual es concordante con la falta de conservación del cambio generado en el alineamiento de Mutation Taster (no se observa en la naturaleza). De acuerdo con los criterios de las BPGM la variante se considera patogénica debido a reportes previos de asociación con DM MODY. Por otro lado esta variante se considera Probablemente Patogénica bajo criterios más astringentes principalmente por la mayor cantidad de criterios de soporte de la variante como patogénica; el fenotipo del paciente afectado y su historia familiar es altamente específica (glucosuria-no insulino-dependencia) para un diagnóstico de DM MODY (Tabla 7).

¹⁶¹ CHI, Young, et al. Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1 α . En: Molecular Cell. Noviembre, 2002, Vol. 10 no. 5., p. 1129–1137.

Figura 14. Cromatogramas con la posición NM_000545:c.475 señalada en primer plano. Se observan dos individuos homocigotos para el alelo C y el heterocigoto para la mutación c.475C>T en detalle.

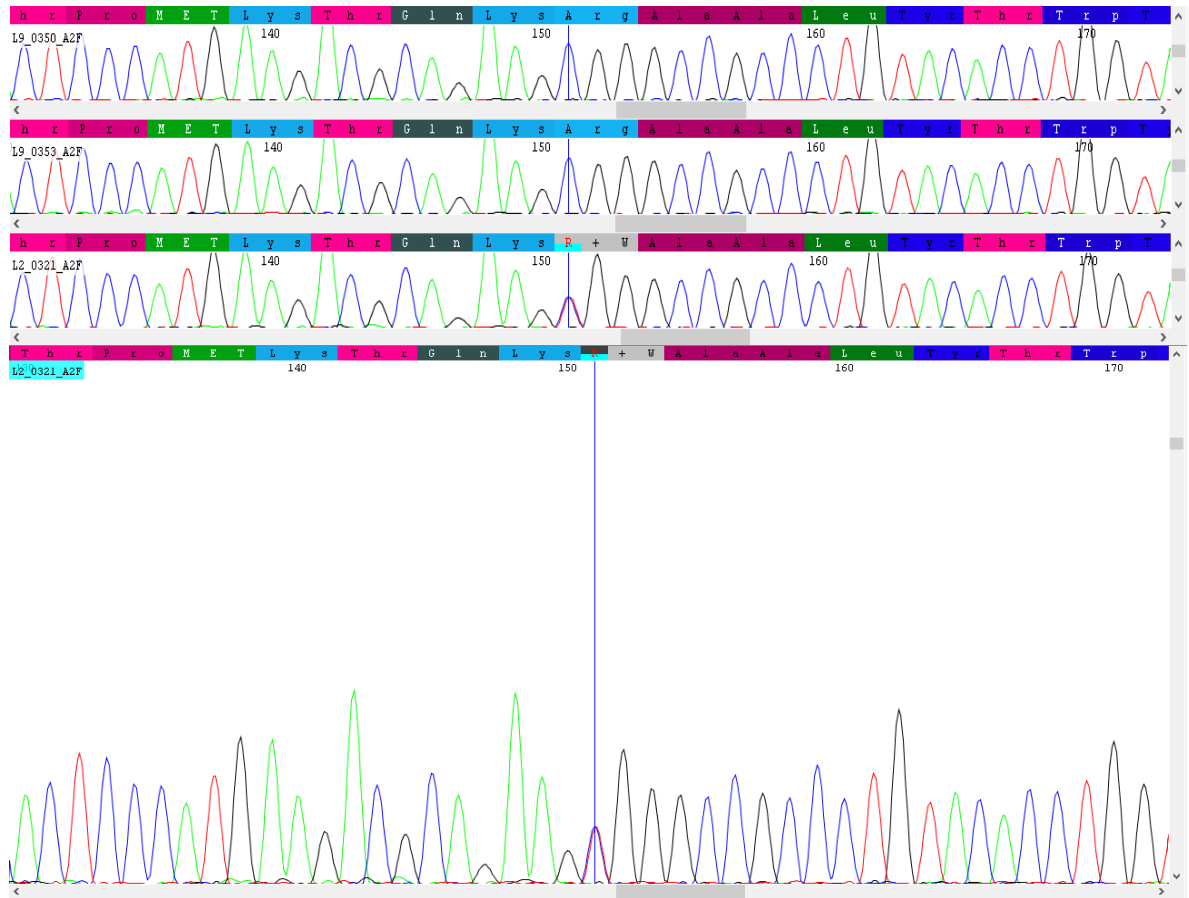


Tabla 8. Clasificación de patogenicidad y análisis de conservación de las variantes encontradas. **Conservación:** conservación del cambio de AA generado según el alineamiento de Mutation Taster, **BPGM:** Best practice guidelines for the molecular & genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young MODY, P: Patogénica MODY, PP: Probablemente Patogénica, PNP: Probablemente NO Patogénica, **ACMG:** American College of Medical Genetics and Genomics, PP: Probablemente Patogénica, VUS: Variante de Significado clínico Incierto, B: Benigna.

Variante	Cambio	Conservación	BPGM	ACGM
c.475C>T	p.(Arg159Trp)	No conservado	P	PP
c.481G>A	p.(Ala161Thr)	No conservado	P	VUS
c.864G>C	Sinónimo	-	PNP	B
c.1375C>T	Sinónimo	-	PNP	B
c.1460G>A	p.(Ser487Asn)	Conservativo	PNP	B

5. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en el que se analizan seis exones de *HNF1A* como primer abordaje para muestrear población colombiana. Se reporta el primer diagnóstico molecular de DM MODY en el país. De los exones analizados en este estudio, cinco se reportan en la literatura como regiones de ocurrencia de la mayoría de mutaciones de este gen. Concretamente los exones 1 al 6 representan un 81% de las mutaciones causantes de acuerdo algunos estudios ^{162, 163}. Esto puede deberse a la configuración estructural de *HNF1A*. Esta proteína tiene las secuencias más altamente conservadas hacia el extremo amino terminal, donde se localiza el

¹⁶² AWA, Walter, et al. Genetic and clinical characteristics of patients with HNF1A gene variations from the German-Austrian DPV database. En: European Journal of Endocrinology. Enero, 2011, Vol. 164 no. 4., p. 513–520.

¹⁶³ BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, et al. The Type and the Position of HNF1A Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)-3. En: Diabetes. Febrero, 2008, Vol. 57 no. 10., p. 503–508.

dominio de unión al ADN y un homeodominio tipo POU atípico. Este tipo de homeodominio presenta muy alto grado de conservación lo cual hace susceptibles a las proteínas que los tienen a ser afectadas por todo tipo de mutación de sentido erróneo. Los dominios POU de *HNF1A* se localizan entre los codones 203 y 276, exones 3 y 4 (posiciones NM_000545.6:r.808-1029)¹⁶⁴, ambos de los cuales son evaluados en este estudio. La susceptibilidad de este dominio POU de *HNF1A* a las mutaciones queda evidenciada de la mano de reportes de la existencia de un “mutational hot spot” o punto crítico para la aparición de mutaciones en el exón 4¹⁶⁵. En este estudio que las mutaciones con mayor probabilidad de afectar el funcionamiento de la proteína y menor frecuencia poblacional tuvieron ocurrencia en las regiones más cercanas a su extremo amino terminal. En el exón 2 se encontraron dos mutaciones patogénicas no sinónimas y en el exón 7 se encontró un polimorfismo no sinónimo el cual de alta frecuencia en la población. Estos efectos son concordantes con los reportes que indican que la mayor prevalencia de mutaciones patogénicas se encontrará rastreando los primeros exones.

En este estudio se identifican cinco variantes de *HNF1A* previamente reportadas. De estas solo se consideró causante de DM tipo MODY a c.475C>T. Dicha variante se ha clasificado como patogénica causante de DM MODY en bases de datos. En este caso el paciente afectado presenta características clínicas concordantes con diagnóstico de DM MODY subtipo 3. Dichas características incluyen glucosuria, herencia autosómica dominante de DM antes de los 30 años, peso normal, un valor de HbA1c no tan alto (8.2%), negatividad para auto-anticuerpos anti-pancreáticos y ausencia de eventos de cetosis o cetoacidosis. La glucosuria es distintiva en la DM

¹⁶⁴ CHI, Young, et al. Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1 α . En: Molecular Cell. Noviembre, 2002, Vol. 10 no. 5., p. 1129–1137.

¹⁶⁵ KAISAKI, Pamela, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. En: Diabetes. 1997, Vol. 46, No. 3, p. 528–535.

MODY causada por este subtipo^{166, 167}, se tiene registro de un valor de HbA1c que queda incluido en el rango reportado para DM MODY3 en población europea y del sur de Brasil, $7.4 \pm 1.6\%$ y $7.06 \pm 1.6\%$ respectivamente^{168, 169}. Al comparar la edad de diagnóstico del paciente afectado por c.475C>T se repite la observación, en donde el dato observado queda incluido dentro del rango reportado en otros estudios para la misma mutación (11-20 años, promedio de 15.5 años)¹⁷⁰. Los datos observados contrastados con la literatura hacen evidente el diagnóstico de DM MODY en este paciente.

En este estudio se reporta una variante asociada a DM MODY de significado clínico incierto c.481G>A (rs201095611) en un sujeto diagnosticado con DM tipo 1. En la literatura esta variante también se asocia al síndrome del *Nevo Melanocítico Congenito* (NMC)^{171, 172}. Al emplear los criterios de la guía clasificatoria BPGM esta variante podría considerarse como patogénica causante de DM MODY debido a su baja frecuencia (0.00024 en ExAC; ausente en 1000G) y asociación con DM MODY en la literatura^{173, 174}. Sin embargo en este estudio el paciente afectado presentó un diagnóstico de DM1 con positividad para auto-anticuerpos e insulino-dependencia.

¹⁶⁶ MENZEL, Ruth, et al. A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) gene. En: *Diabetic Medicine*. 1998, Vol. 15 no.10., p. 816–820.

¹⁶⁷ LACHANCE, Carl-Hugo. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. En: *Canadian Journal of Diabetes*. Noviembre, 2016.

¹⁶⁸ SAKINA, Kherra, et al. Precision medicine for monogenic diabetes : from a survey to the development of a next-generation diagnostic panel. Noviembre, 2017, p. 1–9.

¹⁶⁹ MURUSSI, Jorge de Faria, et al. HNF1 α Mutations Are Present in Half of Clinically Defined MODY Patients in South-Brazilian Individuals. En: *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia (ABE&M)*. 2008, Vol. 52 no. 8., p. 1326–1331.

¹⁷⁰ FRAYLING, Timothy, 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. En: *Diabetes*. Abril, 1997 Vol. 46., p. 720-725.

¹⁷¹ BANSAL, Vikas. Spectrum of mutations in monogenic diabetes genes identified from high-throughput DNA sequencing of 6888 individuals. En: *BMC Medicine*. Abril, 2017, Vol.213, no. 15., p. 1–14.

¹⁷² PAWLIKOWSKI, Jeffrey, et al. Acute Inhibition of MEK Suppresses Congenital Melanocytic Nevus Syndrome in a Murine Model Driven by Activated NRAS and Wnt Signaling. En: *Journal of Investigative Dermatology*. 2015, Vol. 135 no. 8., p. 2093–2101.

¹⁷³ CHÉVRE, Jean-Claude, et al. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. En: *Diabetologia*. Abril, 1998, Vol. 41, no. 9., p. 1017–1023.

¹⁷⁴ CHI, Young, et al. Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1 α . En: *Molecular Cell*. Noviembre, 2002, Vol. 10 no. 5., p. 1129–1137.

La observación de variantes asociadas a DM MODY en pacientes con valores positivos para auto-anticuerpos no es nueva¹⁷⁵. La respuesta al tratamiento con sulfonilureas en estos pacientes puede llegar a ser similar a lo observado en pacientes con DM MODY subtipo 3 con valores negativos para auto-anticuerpos¹⁷⁶. Por lo anterior se recomienda considerar el tratamiento con sulfonilureas en este paciente. Otras características del paciente fueron la delgadez dentro del rango aceptable de acuerdo con su IMC, altas concentraciones de HbA1c (10.7%) y bajo nivel de péptido C (0.48 ng/ml). En la literatura c.481G>A ha sido observada en controles con niveles normales de glucosa en ayunas y HbA1c (<6%) sin evidencia de positividad para auto-anticuerpos anti-pancreáticos¹⁷⁷. Estos datos contradictorios son concordantes con la clasificación de significado clínico incierto que se le da a esta variante bajo uso del esquema clasificatorio de la ACMG. En cuanto a su relación con el síndrome del NMC, la variante puede causar desregulación de la vía de señalización WNT cuando el paciente afectado reporta aparición neonatal del NMC. En individuos con síndrome del NMC, esta y otras variantes se asocian a la aparición temprana de neoplasias malignas, mayor tamaño del nevo y otras características extra-cutáneas¹⁷⁸. En este estudio el paciente afectado no reporta NMC por lo cual las características cutáneas y extra-cutáneas se descartan.

La variante c.864G>C (rs56348580) es un polimorfismo, en la población de estudio la frecuencia alélica del alelo discordante C fue de 0.260 (0.210-0.314) estando presente en 65 pacientes con diagnóstico de DM recibido antes de los 30 años. Esto

¹⁷⁵ URBANOVÁ, Jana, et al. Positivity for islet cell autoantibodies in patients with monogenic diabetes is associated with later diabetes onset and higher HbA1c level. En: *Diabetic Medicine*. 2014, Vol. 31 no. 4., p. 466–471.

¹⁷⁶ URBANOVÁ, Jana, et al. Should the negativity for islet cell autoantibodies be used in a prescreening for genetic testing in maturity-onset diabetes of the young? The case of autoimmunity-associated destruction of pancreatic β -cells in a family of HNF1A-MODY subjects. En: *International Archives of Allergy and Immunology*. 2013, Vol. 161 no. 3., p. 279–284.

¹⁷⁷ BANSAL, Vikas. Spectrum of mutations in monogenic diabetes genes identified from high-throughput DNA sequencing of 6888 individuals. En: *BMC Medicine*. Abril, 2017, Vol.213, no. 15., p. 1–14.

¹⁷⁸ PAWLIKOWSKI, Jeffrey, et al. Acute Inhibition of MEK Suppresses Congenital Melanocytic Nevus Syndrome in a Murine Model Driven by Activated NRAS and Wnt Signaling. En: *Journal of Investigative Dermatology*. 2015, Vol. 135 no. 8., p. 2093–2101.

difiere a lo hallado pacientes normoglucémicos en donde el alelo C tiene una frecuencia mayor, de 0.330¹⁷⁹. Este alelo se reporta en población hispanoamericana, afroamericana y blanca, y con extremadamente baja frecuencia en población japonesa^{180, 181, 182, 183, 184}. En población americana (AMR) reportada por el proyecto 1000G su frecuencia fue de 0.415 mayor a la que se halló en este estudio¹⁸⁵. Estos datos reflejan diferencias que pueden ser debidas al muestreo de distintos núcleos de población americana como serian Santander y Antioquia, pues el proyecto 1000G incluye únicamente genomas provenientes de Medellín.

En este estudio las variantes c.1375C>T y c.1460G>A muestran evidencia de segregarse como haplotipo pues solo en uno de los 72 genotipos con registro de c.1460G>A no aparece la primera. Esto se reporta varias veces en la literatura en donde la correlación entre estas variantes alcanza un r^2 pareado de 0.997^{186, 187}. La variante no sinónima c.1460G>A aparece en todas sus formas alélicas en este estudio con una frecuencia alélica de 0.332 (0.278-0.389). Esta genera un cambio de serina por asparagina considerado un cambio conservativo por las características fisicoquímicas semejantes entre ambos aminoácidos. Lo anterior no

¹⁷⁹ YAMAGATA, Kazuya, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). En: Nature. Enero, 1996, Vol. 95., p. 407-423.

¹⁸⁰ DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, Aarón, et al. Mutations in MODY genes are not common cause of early-onset type 2 diabetes in Mexican families. En: Journal of the Pancreas. Mayo 2005, Vol. 6 no. 3, p. 238–245.

¹⁸¹ THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. En: Nature. Enero, 2015, Vol. 526 no. 7571., p. 68–74.

¹⁸² LEK, Monkol, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. En: Nature. 2016, Vol. 536 no. 76., p. 285–291.

¹⁸³ KAWASAKI, Eiji, et al. Identification and Functional Analysis of Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor-1a Gene in Anti-Islet Autoantibody-Negative Japanese Patients with Type 1 Diabetes. En: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. Septiembre, 1999, Vol. 85 no. 1., p. 331–335.

¹⁸⁴ JOHANSEN, Erick, et al. Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1. En: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Mayo, 2005, Vol. 90 no. 8., p. 4607–4614.

¹⁸⁵ THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, Op. Cit, p. 68–74.

¹⁸⁶ DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, Op. Cit, p. 238–245.

¹⁸⁷ REINER, Alexander, et al. Common coding variants of the HNF1A gene are associated with multiple cardiovascular risk phenotypes in community-based samples of younger and older European-American adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults study and the Cardiovascula. En: Circ Cardiovasc Genet. 2009, Vol. 2 no. 3., p. 244–254.

descarta que tenga efectos fenotípicos, en un estudio con población saudí c.1375C>T se asocia a infarto del miocardio, a DM2 y niveles altos de colesterol LDL y DM2. En este trabajo se plantea que la región genómica en donde se encuentra la variante podría tener secuencias de importancia más allá de *HNF1A* interviniendo debido a los resultados encontrados. En un estudio independiente al de población saudí se hallan resultados similares con niveles más bajos de CRP y GGT, niveles más altos de colesterol LDL, apolipoproteína B, creatinina y fibrinógeno, en población americana de origen europeo, adultos jóvenes y adultos mayores, y asociación a un mayor riesgo de aterosclerosis coronaria subclínica. Probablemente los resultados del primer estudio sean debidos a la segregación de c.1375C>T como haplotipo con c.1460G>A, pues las frecuencias de estas reportadas en población mundial son similares. En este estudio los valores de LDL del grupo sin la variante son mayores al grupo con esta sin embargo no difieren significativamente, se recomienda ampliar la muestra y estar atentos a la observación de cambios sutiles en los pacientes para su detección.

6. CONCLUSIONES

En este estudio se analizan seis exones del gen *HNF1A* en una población nueva con diagnóstico de DM de inicio juvenil. Se identifican dos mutaciones de las cuales una se considera causante de DM tipo MODY. Este es el primer registro confirmado por secuenciación de MODY en el país.

La segunda mutación patogénica c.481G>A muestra efectos deletéreos en simulaciones y análisis de conservación, así mismo se asocia con DM MODY en estudios previos pero la clasificación ACMG que reporta esta variante es de significado clínico incierto (VUS). En este estudio c.481G>A se presenta en un paciente con características clínicas más cercanas a la DM tipo 1. El sujeto de estudio afectado permanece con el diagnóstico de DM1 debido principalmente a la positividad para auto-anticuerpos.

Los individuos con la variante c.1460G>A [ligada a c.1375C>T (rs2259820)] evaluados en este estudio presentan valores de LDL en promedio más altos que el resto de la población pero la magnitud del efecto no alcanza a ser significativamente diferente. c.1460G>A se asocia a un nivel mayor de LDL así como otros efectos fenotípicos incluyendo la DM2 en datos de estudios independientes. Ampliar la muestra incluyendo controles sin diagnóstico de DM y realizar un seguimiento a los pacientes de este estudio podría generar la evidencia que se requiere para establecer si hay riesgo asociado y cuanta es su magnitud.

Se espera que estos resultados contribuyan al conocimiento de la DM MODY en la región.

7. RECOMENDACIONES

La prevalencia de DM MODY obtenida en este estudio fue baja con respecto a MODYX. Esto se observa al analizar el número de pacientes con DM MODY diagnosticada clínicamente que no presentaron mutaciones. Se recomienda aumentar la muestra analizada con poblaciones de otras ciudades, así como secuenciar el resto del gen e incluir otros genes implicados en DM tipo MODY como *GCK*. Los estudios con secuenciación de siguiente generación pueden ser una buena alternativa para muestrear varios genes MODY al mismo tiempo en esta población.

No es la primera vez que se observan variantes de *HNF1A* asociadas a DM MODY en un contexto de positividad para auto-anticuerpos y DM tipo 1. Este es el caso de c.481G>A en este estudio. Respecto al tratamiento con sulfonilureas se ha reportado que en estos casos los resultados de llevarlo a cabo pueden ser similares e igual de beneficiosos a los observados en pacientes MODY con negatividad para auto-anticuerpos. Por lo anterior se considera que el tratamiento con sulfonilureas en el paciente 0317 afectado por la mutación c.481G>A puede ser recomendable.

La variante c.1460G>A (rs2464196) puede tener efectos fenotípicos subclínicos de acuerdo con registros de la literatura los cuales no fueron detectados en este estudio. Debido a que este es un tipo de estudio descriptivo se considera que no se recolecta suficiente evidencia para rechazar la asociación de 1460G>A con las características fenotípicas descritas. Por lo anterior se recomienda ampliar la muestra bajo análisis incluyendo controles y estar atentos a la observación de cambios sutiles en las variables y síntomas clínicos referenciados en la literatura en los pacientes analizados.

BIBLIOGRAFÍA

ADZHUBEI, Ivan; JORDAN, Daniel y SUNYAEV, Shamil. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. En: Current Protocols in Human Genetics. Enero, 2013, Vol. 76 no. 1., p. 69-87.

AFONSO, Paula, *et al.* Maturity onset diabetes of young type 2 due to a novel de novo GKC mutation. En: Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. Noviembre, 2014, Vol. 58 no. 7., p. 772–775.

AGUILAR-SALINAS, Carlos, *et al.* Early-onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the mexican population. En: The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Octubre, 2001, Vol. 86 no. 1., p. 220–226.

AMED, Shazhan, y ORAM, Richard. Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): Making the Right Diagnosis to Optimize Treatment. En: Canadian Journal of Diabetes. Marzo, 2016, p. 1–6.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. En: Diabetes Care. Enero, 2014, Vol. 38 no. 2., p. 81–90.

AWA, Walter, *et al.* Genetic and clinical characteristics of patients with HNF1A gene variations from the German-Austrian DPV database. En: European Journal of Endocrinology. Enero, 2011, Vol. 164 no. 4., p. 513–520.

BANSAL, Vikas. Spectrum of mutations in monogenic diabetes genes identified from high-throughput DNA sequencing of 6888 individuals. En: BMC Medicine. Abril, 2017, Vol.213, no. 15., p. 1–14.

BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, *et al.* The Type and the Position of HNF1A Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)-3. En: *Diabetes*. Febrero, 2008, Vol. 57 no. 10., p. 503–508.

BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, *et al.* ABCC8 and KCNJ11 molecular spectrum of 109 patients with diazoxide-unresponsive congenital hyperinsulinism. En: *Journal of Medical Genetics*. Enero, 2010, Vol. 47 no. 11., p. 752–759.

BONATTO, Naieli, *et al.* Variants of the HNF1A gene: A molecular approach concerning diabetic patients from southern Brazil. En: *Genetics and Molecular Biology*. Julio, 2012, Vol. 35 no. 4., p. 737–740.

BONNEFOND, Amélie, *et al.* Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. En: *PLoS ONE*. Junio, 2012, Vol. 7 no. 6. P. 37-45.

BONNEFOND, Amélie, *et al.* Reassessment of the putative role of BLK-p.A71T loss-of-function mutation in MODY and type 2 diabetes. En: *Diabetologia*. Septiembre, 2013, Vol. 56 no. 3., p. 492–496.

BOROWIEC, Maciej, *et al.* Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Junio, 2009, Vol. 106, p. 14460-14465.

BOWMAN, Patrick, *et al.* Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. En: *Diabetologia*. Agosto, 2012, Vol. 55 no. 1., p. 123–127.

CAETANO, Lilian, *et al.* Clinical application of ACMG-AMP guidelines in HNF1A and GCK variants in a cohort of MODY families, (November 2016). *Febrero*, 2017, p. 388–396.

CHAMBERS, Christina, *et al.* Characteristics of maturity onset diabetes of the young in a large diabetes center. En: *Pediatric Diabetes*. Mayo, 2015, Vol. no. 1., p. 1–8.

CHÈVRE, Jean-Claude, *et al.* Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. En: *Diabetologia*. Abril, 1998, Vol. 41, no. 9., p. 1017–1023.

CHI, Young, *et al.* Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1 α . En: *Molecular Cell*. Noviembre, 2002, Vol. 10 no. 5., p. 1129–1137.

CHOI, Yongwook, y CHAN, Agnes. PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. En: *Bioinformatics*. Marzo, 2015, Vol. 31 no. 16., p. 2745–2747.

CODNER, Ethel, *et al.* Mild fasting hyperglycemia in children: High rate of glucokinase mutations and some risk of developing type 1 diabetes mellitus. En: *Pediatric Diabetes*. Enero, 2009, Vol. 10, no. 6., p. 382–388.

COLCLOUGH, Kevin, *et al.* Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *European Journal of Human Genetics*, Enero, 2014, Vol. 22., p. 1–6.

DELLAMANNA, Thais, *et al.* Clinical follow-up of two Brazilian subjects with glucokinase-MODY (MODY2) with description of a novel mutation. En: *Arquivos Brasileiros de Rasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. Septiembre, 2012, Vol. 56 no. 8., p. 490–495.

DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, Aarón, *et al.* Mutations in MODY genes are not common cause of early-onset type 2 diabetes in Mexican families. En: Journal of the Pancreas. Mayo 2005, 6(3), 238–245.

EDGHILL, Eduard, *et al.* Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. En: Journal of Medical Genetics. 2006, Vol. 43 no. 1., p. 84–90.

EIDE, Sian, *et al.* Prevalence of HNF1A (MODY3) mutations in a Norwegian population (the HUNT2 Study). En: Diabetic Medicine. Abril, 2008, Vol. 25 no. 7., p. 775–781.

ELLARD, Sian; BELLANNÉ-CHANTELOT, Christine, y HATTERSLEY, Andrew. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. En: Diabetologia. Enero, 2008, Vol. 51 no. 4., p. 546–553.

ESTALELLA, Itziar, *et al.* Mutations in GCK and HNF-1 α explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. En: Clinical Endocrinology. Abril, 2007, Vol. 67 no. 4., p. 538–546.

EWING, Brent, *et al.* Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using. En: Genome Research. 2005, Vol. 206., p. 175–185.

FAJANS, Stefan; BELL, Graeme, y POLONSKY, Kenneth. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. En: English Journal. Septiembre, 2001, Vol. 345 no.13., p. 971–980.

FATEHI, Mohammad, *et al.* Molecular determinants of ATP-sensitive potassium channel MgATPase activity: diabetes risk variants and diazoxide sensitivity. En: Bioscience Reports. 2015, Vol. 35., p. 1–11.

FLANNICK, Jason; JOHANSSON, Stefan, y NJØLSTAD, Pål. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. En: Nature Reviews Endocrinology. Abril, 2016, Vol. 12 no. 7., p. 394–406.

FOKKEMA, Ivo, *et al.* LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. En: Human Mutation. Diciembre, 2011, Vol. 32 no. 5., p. 557–563.

FRAYLING, Timothy, *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. En: Diabetes. Abril, 1997 Vol. 46., p. 720-725.

FURUZAWA, Gilberto, *et al.* Low prevalence of MODY2 and MODY3 mutations in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype. En: Diabetes Research and Clinical Practice. Junio, 2008, Vol. 81, no. 3., p. 12–14.

GEER, Lewis, *et al.* The NCBI BioSystems database. En: Nucleic Acids Research. Septiembre, 2012, Vol. 38., p. 492–496.

GIUFFRIDA, Fernando, *et al.* A novel glucokinase deletion (p.Lys32del) and five previously described mutations co-segregate with the phenotype of mild familial hyperglycaemia (MODY2) in Brazilian families. En: Diabetes Research and Clinical Practice. Enero, 2013, Vol. 100, no. 2., p. 2–5.

HARRIES, Lorna, *et al.* Isoforms of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 α show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. En: Human Molecular Genetics. Junio, 2006, Vol. 15 no. 14., p. 2216–2224.

HATTERSLEY, Andrew. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. En: *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*. Octubre, 1998, Vol. 15 no. 1., p. 15–24.

JOHANSEN, Erick, *et al.* Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1. En: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Mayo, 2005, Vol. 90 no. 8., p. 4607–4614.

KAISAKI, Pamela, *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. En: *Diabetes*. 1997, Vol. 46, No. 3, p. 528–535.

KAWASAKI, Eiji, *et al.* Identification and Functional Analysis of Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor-1a Gene in Anti-Islet Autoantibody-Negative Japanese Patients with Type 1 Diabetes. En: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Septiembre, 1999, Vol. 85 no. 1., p. 331–335.

KLEINBERGER, Jeffrey y POLLIN, Toni. Undiagnosed MODY: Time for Action. En: *Current Diabetes Reports*. 2015, Vol. 15 no. 12., p. 1-17.

LACHANCE, Carl-Hugo. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. En: *Canadian Journal of Diabetes*. Noviembre, 2016.

LANDRUM, Melissa, *et al.* ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. En: *Nucleic Acids Research*. 2014, Vol. 42 no. 1, p. 980–985.

LEHTO, Markku, *et al.* High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. En: *Diabetologia*. 1999, Vol. 42 no. 9., p. 1131–1137.

LEK, Monkol, *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. En: *Nature*. 2016, Vol. 536 no. 76., p. 285–291.

LIMA, Renata, *et al.* Maturity-onset diabetes of the young (MODY) in Brazil: Establishment of a national registry and appraisal of available genetic and clinical data. En: *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2017, Vol. 123., p. 134–142.

MAASSEN, Johannes; JANSSEN, George, y HART, Leen. Molecular mechanisms of mitochondrial diabetes (MIDD). En: *Annals of Medicine*. 2005, Vol. 37 no. 3., p. 213–221.

MADDEN, Tom. Chapter 16 : The BLAST Sequence Analysis Tool. In *The NCBI Handbook* [En línea]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). 2002. (Recuperado el 12 de octubre de 2018) Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>

MANIATIS, Tom; FRITSCH, Edward, y SAMBROOK, Joseph. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. S. L.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. p. 1246-1789. ISBN 087969 1360.

MENZEL, Ruth, *et al.* A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) gene. En: *Diabetic Medicine*. 1998, Vol. 15 no.10., p. 816–820.

MITCHELL, Simon, y FRAYLING, Timothy. The role of transcription factors in maturity-onset diabetes of the young. En: *Molecular Genetics and Metabolism*. 2002, Vol. 77 no. 1–2., p. 35–43.

MOLVEN, Anders, y NJØLSTAD, Pal. Role of molecular genetics in transforming diagnosis of diabetes mellitus. En: *Expert Review in Molecular Diagnosis*. 2012, Vol. 11 no. 3., p. 313–320.

MOLVEN, Anders, *et al.* Mutations in the Insulin Gene Can Cause MODY and Autoantibody-Negative Type 1 Diabetes. En: *Diabetes*. Abril, 2008, Vol. 57., p. 1131–1135.

MOTA, Adolfo; BRÜGGEMANN, Simone, y COSTA, Fabricio. MODY 2: Mutation identification and molecular ancestry in a Brazilian family. En: *Gene*. 2013, Vol. 512, no. 2., p. 486–491.

MURUSSI, Jorge de Faria, *et al.* HNF1 α Mutations Are Present in Half of Clinically Defined MODY Patients in South-Brazilian Individuals. En: *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia (ABE&M)*. 2008, Vol. 52 no. 8., p. 1326–1331.

NAYA, Francisco; STELLRECHT, Christine, y TSAI, Ming-Jer. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. En: *Genes & Development*. 1995, Vol. 9 no. 8., p. 1009–1019.

NEGAHDAR, Maria, *et al.* (2014). GCK-MODY diabetes as a protein misfolding disease: The mutation R275C promotes protein misfolding, self-association and cellular degradation. En: *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014, Vol. 382 no. 1., p. 55–65.

OMIM. O. MENDELIAN I. IN M [En línea]. Baltimore MD: McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University. 2015. (Recuperado en 28 de septiembre de 2017) Disponible en <https://omim.org/>

OSBAK, Kara, *et al.* Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. En: Human Mutation. 2009, Vol. 30 no. 11., p. 1512–1526.

OWCZARZY, Richard, *et al.* IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. En: Nucleic Acids Research. 2008, Vol. 36, p. 163-9.

OWEN, Katharine. RD Lawrence lecture 2012 Assessing aetiology in diabetes: how C-peptide, CRP and fucosylation came to the party! En: Diabetic Medicine. 2013, Vol. 30 no. 3., p. 260–266.

PAWLIKOWSKI, Jeffrey, *et al.* Acute Inhibition of MEK Suppresses Congenital Melanocytic Nevus Syndrome in a Murine Model Driven by Activated NRAS and Wnt Signaling. En: Journal of Investigative Dermatology. 2015, Vol. 135 no. 8., p. 2093–2101.

PRUDENTE, Sabrina, *et al.* Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus. En: American Journal of Human Genetics. 2015, Vol 97 no. 1, p. 177–185.

REGINA, Moises; REIS, Andre, y MOREL, Valerie. Prevalence of Maturity-Onset Diabetes of the Young Mutations in Brazilian Families With Autosomal- Dominant Early- Onset Type 2 Diabetes. En: Diabetes Care. 2001, Vol. 24 no. 4., p. 786–797.

REINER, Alexander, *et al.* Common coding variants of the HNF1A gene are associated with multiple cardiovascular risk phenotypes in community-based samples of younger and older European-American adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults study and the Cardiovascula. En: *Circ Cardiovasc Genet.* 2009, Vol. 2 no. 3., p. 244–254.

RICHARDS, Sue, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. En: *Genetics in Medicine.* 2015, Vol. 17, No. 5, p. 405–424.

ROZEN, Steve, y SKALETSKY, Helen. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers [En línea]. Clifton, N.J.: *Methods in Molecular Biology*, 132, 365–386. 2000. (Recuperado en 3 de marzo de 2017) Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547847>

SAKINA, Kherra, *et al.* Precision medicine for monogenic diabetes : from a survey to the development of a next-generation diagnostic panel. Noviembre, 2017, p. 1–9.

SAN LUCAS, Anthony, *et al.* Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. En: *Bioinformatics.* 2012, Vol. 28 no. 3., p. 421–422.

SCHWARZ, Jana Marie, *et al.* MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. En: *Nature Methods.* 2014, Vol. 11 no. 4., p. 361–362.

SIM, Ngak-Leng, *et al.* SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. En: *Nucleic Acids Research.* 2012, Vol. 40, No. 1., p. 452–457.

STENSON, Peter, *et al.* HGMD: The Human Gene Mutation Database: 2008 update. En: *Genome Medicine*. 2009, Vol. 1 no. 1., p. 13.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. En: *Nature*. Enero, 2015, Vol. 526 no. 7571., p. 68–74.

TIMSIT, José, *et al.* Searching for Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): When and What for? En: *Canadian Journal of Diabetes*. 2016, p. 1–7.

URBANOVÁ, Jana, *et al.* Should the negativity for islet cell autoantibodies be used in a prescreening for genetic testing in maturity-onset diabetes of the young? The case of autoimmunity-associated destruction of pancreatic β -cells in a family of HNF1A-MODY subjects. En: *International Archives of Allergy and Immunology*. 2013, Vol. 161 no. 3., p. 279–284.

URBANOVÁ, Jana, *et al.* Positivity for islet cell autoantibodies in patients with monogenic diabetes is associated with later diabetes onset and higher HbA1c level. En: *Diabetic Medicine*. 2014, Vol. 31 no. 4., p. 466–471.

VALLONE, Peter, y BUTLER, John. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. En: *BioTechniques*. 2004, Vol. 37., p. 226–231.

WEINERT, Leticia, *et al.* Three unreported glucokinase (GCK) missense mutations detected in the screening of thirty-two Brazilian kindreds for GCK and HNF1A-MODY. En: *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014, Vol. 106 no. 2., p. 44–48.

WHEELER, David, *et al.* NCBI Database resources of the national center for biotechnology [En línea]. *Nucleic Acids Research*. 2003. (Recuperado el 03 de diciembre de 2018) Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | 10 facts about diabetes [En línea].
Genova: Global Report on Diabetes. World Health Organization. 2016. (Recuperado
en 15 de julio de 2016) Disponible en
<http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/>.

YAMAGATA, Kazuya, *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene
in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). En: Nature. Enero, 1996, Vol. 95.,
p. 407-423.

ZERBINO, Daniel, *et al.* (2018). Ensembl [En línea]. S. L.: Nucleic Acids Research.
2018. (Recuperado el 25 de octubre de 2018) Disponible en
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1098>

ANEXOS

ANEXO A: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio: Análisis clínico y detección de mutaciones de los genes GCK y HNF1A en pacientes con diabetes mellitus tipo MODY en Santander-Colombia

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por la Universidad Industrial de Santander, Hospital Universitario de Santander, Clínica Materno Infantil San Luis, Fundación Santandereana de Diabetes y Obesidad (FUSANDE) y la Caja de Previsión Social de la Universidad Industrial de Santander (CAPRUIS)

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos en la realización de este estudio: (a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. (b) El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permite clarificar muchos conceptos sobre la enfermedad y su mecanismo de herencia, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros individuos afectados. (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente. (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras, así como tampoco el desarrollo de patentes con base en el material genético. (f) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Departamento de Ciencias Básicas. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrán acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este

estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. (g) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. (h) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con:

Gustavo Contreras, MD, Especialista en Genética Médica-Especialista en Bioética

Tel 643400 (Ext. 3131)

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO:

El objetivo principal de este estudio investigativo es el de:

Describir las características clínicas y paraclínicas de pacientes con Diabetes Mellitus tipo MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) y detectar la presencia de mutaciones en los genes *GCK* y *HNF1A*.

PROCEDIMIENTO:

Se llenará formato de recolección de datos (ANEXO 3) con su información familiar y su historia clínica. El investigador realizará además un árbol genealógico. Se realizará una toma de sangre venosa periférica del antebrazo mediante técnica adecuada por parte del personal entrenado del Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud. Este procedimiento le puede traer como consecuencia dolor y en muy raras ocasiones hematoma o infección en el sitio de punción.

Estas muestras serán manejadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio. Las muestras para este estudio serán analizadas en su totalidad en los laboratorios de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

RIESGOS E INCOMODIDADES

La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento.

BENEFICIOS ADICIONALES:

Este estudio tiene para usted el(los) siguiente(s) beneficio(s) adicional(e)s:

1. Identificar las alteraciones moleculares presentes en los genes relacionados con Diabetes Mellitus tipo MODY, lo cual permitirá poder tener una asesoría genética completa, unas posibles recomendaciones para el pronóstico y manejo terapéutico de su enfermedad.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

MANEJO DE RESULTADOS:

Los resultados de los estudios genéticos solo le serán revelados cuando representen una ayuda diagnóstica para la entidad objeto de este estudio; estos resultados le serán entregados durante consulta clínica, en un informe y con asesoría genética correspondiente.

OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE:

AUTORIZACION:

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:

- En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún Si No miembro de mi familia :
- En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve Si No en anonimato mis datos de identificación:
- En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando Si No se conserve en anonimato mis datos de identificación:
- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se Si No conserve en anonimato mis datos de identificación:

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA
EN EL ESTUDIO:**

Yo, _____ identificado con documento de
identificación: No. _____ de _____, acepto voluntariamente
que se tome una muestra de _____ a mi o a mi hijo/a del cual
son el representante legal, con el fin de realizar análisis de
_____. Así mismo, declaró que se
me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material
de muestra.

Nombre del paciente, acudiente o representante legal:

Firma: _____

Número de Documento: _____

Fecha: Día__ __ Mes__ __ Año__ __ __ __

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____ Cédula _____

Fecha: Día__ __ Mes__ __ Año__ __ __ __

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____ Cédula _____

Fecha: Día __ __ Mes __ __ Año __ __ __ __

Investigador

ANEXO B: ASENTIMIENTO INFORMADO

Estudio: Análisis clínico y detección de mutaciones de los genes GCK y HNF1A en pacientes con diabetes mellitus tipo MODY en Santander-Colombia

Vamos a realizar un estudio sobre Diabetes, como tú presentas este diagnóstico, el estudio tratará de identificar la causa de tu problema, esto podrá ayudarte a ti, tu familia y a otras personas que tengan lo mismo.

Si aceptas estar en nuestro estudio, te haremos algunas preguntas a ti y tus padres. Por ejemplo ¿A qué edad te hicieron el diagnóstico de Diabetes? Adicionalmente se tomará una muestra de sangre, para esto usaremos una aguja de las normales que se usan para extraer sangre, la cual se tomara de un brazo.

Puedes hacer preguntas las veces que quieras en cualquier momento del estudio. Además, si decides que no quieres terminar el estudio, puedes parar cuando quieras. Nadie puede enojarse o molestarse contigo si decides que no quieres continuar en el estudio.

Si firmas este papel quiere decir que lo leíste, o alguien te lo leyó y que quieres estar en el estudio. Si no quieres estar en el estudio, no lo firmes. Recuerda que tú decides estar en el estudio y nadie se puede molestar contigo si no firmas el papel o si cambias de idea y después de empezar el estudio, te quieres retirar.

Firma del participante del estudio

Fecha _____

Firma del investigador _____

Fecha _____

ANEXO C: FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ESTUDIO GENÉTICO DE DIABETES TIPO MODY

Código: _____

Identificación

Nombres _____ y _____ Apellidos: _____

Fecha de Nac: _____

Origen: _____ Procedencia: _____

Edad: _____ Sexo: _____

Ocupación: _____ Escolaridad: _____

Dirección: _____ Tel: _____

Antecedentes:

1- Presenta la familia una herencia autosómica dominante (min. 2 generaciones) SI ____ NO ____

2- Al menos uno de los familiares diabéticos se ha diagnosticado antes de los 30 años. SI ____ NO ____

3- Necesidad de insulina al menos durante cinco años después del diagnóstico, SI ____ NO ____

4- Alguna vez ha presentado cetosis/cetoacidosis: SI ____ NO ____

Cuál: _____

5- Glucemia previa al inicio del tratamiento: _____

6- Lactancia Materna Exclusiva: Si ___ No ___ Cuanto tiempo: _____

Datos clínicos:

	Consulta diagnóstico Diabetes	al de	ACTUAL
EDAD			
Talla			
Peso			
IMC			
Tratamiento			

Tipo de diagnóstico de acuerdo a criterios de la ADA:

Diabetes Mellitus tipo 1: _____

Diabetes Mellitus tipo 2: _____

Diabetes Mellitus tipo MODY: _____

Datos analíticos: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa

Fecha: _____

	0'	30'	60'	90'	120'

<i>Glucemia (mg/dl)</i>	_____	_____	_____	_____	_____
<i>Insulinemia (mU/l)</i>	_____	_____	_____	_____	_____

Datos Bioquímicos e Inmunológicos:

Perfil Lipídico Completo:

*Colesterol total:*_____

Colesterol HDL: _____

Colesterol LDL: _____

Colesterol VLDL: _____

Triglicéridos:

Uroanálisis:

Glucosuria: SI:_____ NO:_____

Hemoglobina Glicosilada Primera:

Hemoglobina Glicosilada Última:

Péptido C:

VR:

Autoanticuerpos para GAD:

VR:

Autoanticuerpos para IA-2:

VR:

Anticuerpos ICA:

VR:

Anticuerpos IAA:

VR:

Datos clínicos de los familiares

No.	Nombre y Apellidos	Parentesco	Edad	Diagnóstico	Peso/Talla	Tratamiento	Peso al Nacer de los hermanos
1							
2							
3							
4							

5							
6							
7							

REALIZAR ÁRBOL GENEALÓGICO:

ANEXO D: CARTA AUTORIZACIÓN USO DE MUESTRAS PROYECTO ANIDADO

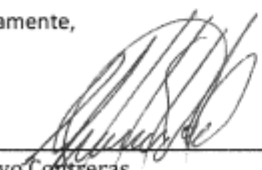
Bucaramanga, 20 de junio de 2017

Señores
Comité de Ética para la Investigación Científica de la UIS (CEINCI-UIS)
Facultad de Salud
Universidad Industrial de Santander

Apreciados señores:

Mediante la presente autorizo al estudiante Misael Leonardo López Cepeda con CC 1018430891, profesional en biología y estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad Industrial de Santander con código 2158818, cuya tesis de maestría se encuentra anidada en el proyecto principal, a que haga uso de las muestras obtenidas en el transcurso del proyecto titulado "ANÁLISIS CLÍNICO Y DETECCIÓN DE MUTACIONES DE LOS GENES GCK Y HNF1A EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO MODY EN SANTANDER-COLOMBIA" aprobado por COLCIENCIAS (código: 110265741650) en la convocatoria 657 de 2014 con código interno de la Universidad Industrial de Santander 8726, de acuerdo con las disposiciones de la **Ley Estatutaria 1581 del 2012**.

Atentamente,



Gustavo Contreras
Médico especialista en Genética Médica y Bioética
Investigador Principal

ANEXO E: CARTA AUTORIZACIÓN USO DE INFORMACIÓN PROYECTO ANIDADO

Bucaramanga, 9 de mayo de 2017

Señores
Comité de Ética para la Investigación Científica de la UIS (CEINCI-UIS)
Facultad de Salud
Universidad Industrial de Santander

Apreciados señores:

En virtud de la **Ley Estatutaria 1581 del 2012**, mediante la cual se dictan las disposiciones generales para la protección de datos personales, se autoriza a la Universidad Industrial de Santander, considerada como entidad responsable y/o encargada del tratamiento de datos personales obtenidos, almacenados en documentos físicos y/o digitales, los cuales incluyen información a reportarse durante el desarrollo del proyecto "ANÁLISIS CLÍNICO Y DETECCIÓN DE MUTACIONES DE LOS GENES GCK Y HNF1A EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO MODY EN SANTANDER-COLOMBIA" en el cual participo como investigador principal. Los datos serán utilizados exclusivamente para las funciones establecidas en la ley 1530 de 2012.

Mediante la presente autorizo al estudiante Misael Leonardo López Cepeda con CC 1018430891, profesional en biología y estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad Industrial de Santander con código 2158818 cuya tesis de maestría se encuentra anidada en el proyecto principal, a que haga uso de los datos obtenidos en el proyecto principal de acuerdo con las disposiciones de la **Ley Estatutaria 1581 del 2012**.

Atentamente,



Gustavo Contreras
Médico Especialista en Genética Médica y Bioética
Investigador Principal