

---

**Trabajo Fin de Máster**  
**Máster en Investigación Biomédica**

---

**“Diabetes monogénica autoinmune  
en pacientes pediátricos  
con clínica de diabetes tipo 1:  
Diagnóstico por secuenciación masiva”**

Autora:

**Andrea Jiménez Sanchis**

Tutor:

**Prof. Dr. Luis Castaño González**

**UPV/EHU**

**Junio 2021**

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
1. DIABETES TIPO 1	5
2. DIABETES TIPO 2	7
3. DIABETES MONOGÉNICA NO AUTOINMUNE	7
3.1. Diabetes tipo MODY	7
3.2. Diabetes neonatal	8
3.3. Formas sindrómicas de diabetes	9
4. DIABETES MONOGÉNICA AUTOINMUNE	9
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
METODOLOGÍA	14
1. PACIENTES	14
2. ANÁLISIS GENÉTICO	15
2.1. Extracción y cuantificación de ADN	15
2.2. Estudio genético mediante <i>NGS</i>	16
2.2.1. Panel de genes	16
2.2.2. Preparación de librerías	17
i. Amplificación del ADN genómico mediante PCR multiplex	18
ii. Digestión parcial de la secuencia de los <i>primers</i>	18
iii. Ligación de adaptadores a los amplicones	18
iv. Purificación de la librería	18
v. Cuantificación del producto amplificado: qPCR	19
2.2.3. Amplificación clonal de la librería	19
2.2.4. Secuenciación masiva	20
2.2.5. Procesamiento bioinformático	20
2.2.6. Filtrado e interpretación de variantes	21
3. ASPECTOS ÉTICOS	23
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

**ACGM:** Colegio Americano de Genética Médica

**ADA:** Asociación Americana de Diabetes

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**APS1:** síndrome poliendocrino autoinmune de tipo 1

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**CNV:** *Copy Number Variation*

**CVID8:** inmunodeficiencia común variable 8

**DM1:** diabetes tipo 1

**DM2:** diabetes tipo 2

**GADA:** *Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody*

**GWAS:** *Genome-Wide Association Studies*

**HLA:** *Human Leukocyte Antigen*

**HGMD:** *Human Gene Mutation Database*

**IAA:** *Insulin Autoantibody*

**IA2A:** *Insulinoma Associated 2 Autoantibody*

**IPEX:** síndrome de inmunodesregulación-poliendocrinopatía-enteropatía ligada al cromosoma X

**ISP:** *Ion Sphere™ Particle*

**MAF:** *Minor Allele Frequency*

**MIDD:** síndrome de diabetes de herencia materna y sordera

**μL:** microlitros

**MODY:** *Maturity-Onset Diabetes of the Young*

**NGS:** *Next-Generation Sequencing* (secuenciación masiva)

**nm:** nanómetros

**OMIM:** *Online Mendelian Inheritance in Man*

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**pM:** picomoles

**SNV:** *Single Nucleotide Variant*

**VUS:** *Variant of Uncertain Significance*

**ZnT8A:** *Zinc Transporter 8 Autoantibody*

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por una hiperglucemia crónica y etiología diversa. En pediatría, el 95% de casos corresponden a una diabetes tipo 1 (DM1), mientras que un pequeño porcentaje es de origen monogénico. Dentro de este grupo poco común, recientemente se han descrito formas monogénicas de diabetes autoinmune cuyo diagnóstico representa un desafío porque pueden superponerse clínicamente con la DM1, caracterizada por la presencia de autoinmunidad al debut.

El objetivo del trabajo fue determinar la existencia de formas raras de diabetes monogénica autoinmune en pacientes pediátricos con DM1 y autoinmunidad positiva al debut, además de dos criterios no excluyentes: edad al diagnóstico inferior a dos años o al menos tres generaciones de diabetes en la familia. Para ello, se realizó un estudio genético mediante secuenciación masiva con un panel de genes que incluía aquellos asociados a esta condición. Aquellas variantes candidatas a ser causantes de la enfermedad se confirmaron por Sanger y fueron estudiadas en los progenitores para comprobar si cosegregaban con la clínica familiar.

Los resultados mostraron que al menos un 3% (2/60) de pacientes con clínica de DM1 eran portadores de una variante probablemente patogénica en heterocigosis, responsable de la diabetes en la familia.

El término ***diabetes mellitus*** agrupa un conjunto de enfermedades cuyo rasgo común son alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, como consecuencia de defectos en la secreción de la insulina, en su acción o en ambos aspectos <sup>[1]</sup>.

Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA) la clasificación aceptada actualmente distingue entre: diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2) y otras formas como la diabetes monogénica o las diabetes de carácter sindrómico <sup>[2]</sup>. Aunque los procesos etiopatogénicos que conducen a los diferentes tipos de diabetes son múltiples y complejos, la característica fundamental que comparten todas ellas, y que las identifica, es la hiperglucemia (concentración elevada de glucosa en sangre). A largo plazo, esta hiperglucemia es la responsable de las complicaciones micro y macrovasculares típicas de la diabetes <sup>[3]</sup>.

## 1. DIABETES TIPO 1

La diabetes tipo 1 (DM1) es una enfermedad compleja, que asocia susceptibilidad genética de carácter poligénico, y se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas, encargadas de la producción de insulina y localizadas en los islotes de Langerhans <sup>[4]</sup>. Dado que todavía no se ha hallado una cura, este trastorno crónico conlleva una dependencia de insulina exógena para el resto de la vida <sup>[5]</sup>.

A pesar de que puede aparecer a cualquier edad, la diabetes tipo 1 es una enfermedad común en la infancia y adolescencia. Mundialmente, su incidencia sigue en aumento y, aunque las frecuencias varían notablemente entre países, se estima que cada año debutan con diabetes más de 100.000 niños <sup>[6]</sup>.

A día de hoy, la etiología de la enfermedad es todavía incierta, pero se postula que el proceso autoinmune que culmina con la destrucción de las células beta pancreáticas es debido a una combinación de factores ambientales que se suman a una predisposición genética existente <sup>[7]</sup>.

La mayor susceptibilidad genética viene determinada por la región *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*), localizada en el cromosoma 6. Entre los genes *HLA*, los más relacionados con la DM1 son los de clase I y clase II <sup>[8]</sup>. En poblaciones caucásicas, los haplotipos que confieren mayor riesgo son el DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 (también conocido como DR3-DQ2) y el DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02 (también conocido como DR4-DQ8) <sup>[4]</sup>.

Asimismo, en los últimos años, a través de *GWAS* (*genome-wide association studies*) se han identificado más de 60 nuevos *loci* situados fuera de la región *HLA*, asociados a un incremento del riesgo a padecer DM1. Mayoritariamente, estos genes están relacionados con la regulación del sistema inmune o con la función de las células beta pancreáticas <sup>[9]</sup>.

El componente genético es necesario, pero no suficiente para desencadenar la enfermedad, ya que hay personas con haplotipos de riesgo que no la desarrollan nunca [6]. Por ese motivo, se considera evidente que numerosos factores ambientales (infecciones víricas, la microbiota intestinal, el estilo de vida, etc.) [10] activan la respuesta autoinmune contra las células beta.

Desde el punto de vista fisiopatológico, la diabetes tipo 1 se caracteriza por la infiltración de linfocitos en los islotes de Langerhans (insulitis), que conduce a la destrucción progresiva de las células beta [11]. La manifestación clínica de la enfermedad suele producirse cuando se ha perdido cerca del 80% de la masa de células beta; sin embargo, la destrucción autoinmune puede haber empezado varios años antes [10]. En consecuencia, en la progresión de la DM1 se distinguen diferentes etapas sucesivas (Figura 1).

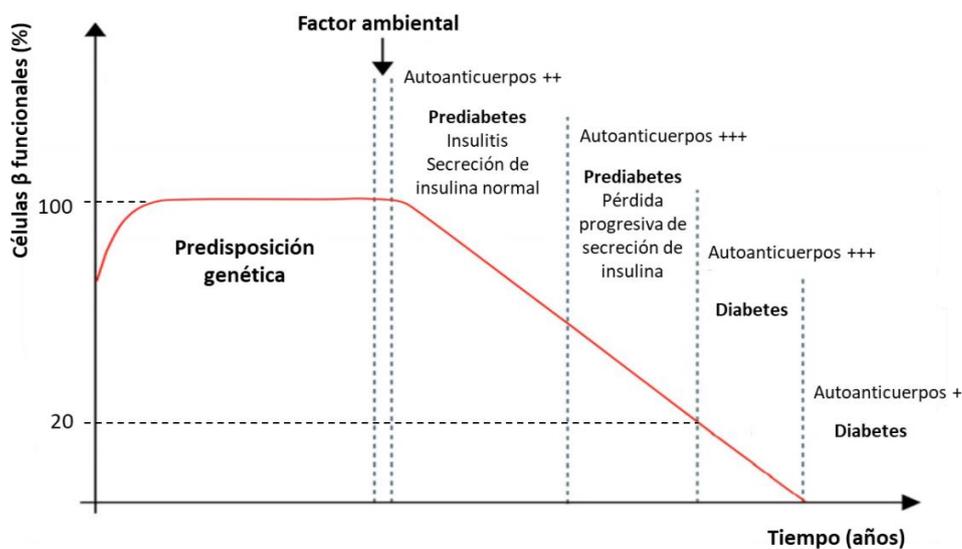


Figura 1: Historia natural y etapas del desarrollo de diabetes tipo 1 [8].

La primera etapa se considera aquella en la que solamente existen marcadores genéticos de susceptibilidad, debido a la predisposición genética (de carácter poligénico) de la persona.

La aparición de un factor ambiental, no totalmente definido, desencadena una activación de la respuesta autoinmune (segunda etapa), evidenciada por la presencia de marcadores serológicos (autoanticuerpos) o celulares (células T CD4+ y CD8+ autorreactivas) de autoinmune. Los cuatro tipos más frecuentes de autoanticuerpos son contra la insulina (IAA), la enzima glutamato descarboxilasa (GADA), la proteína asociada a insulinooma 2 (IA2A) y el transportador de zinc 8 (ZnT8A) [6]. Aunque esta segunda etapa, también conocida como Prediabetes, es asintomática, las células beta del páncreas sufren una agresión autoinmune y empiezan a ser destruidas. Al inicio de esta Prediabetes solamente se detectan marcadores de autoinmune (autoanticuerpos circulantes e infiltración linfocitaria de los islotes de Langerhans o insulitis), pero con parámetros metabólicos normales (normoglucemia, sin déficit demostrable de insulina). En una fase más tardía de la Prediabetes, las células beta pancreáticas resultan insuficientes para mantener una normoglucemia, y estudios funcionales permiten detectar fases de hiperglucemia o hipoinsulinemia, pero aún sin un cuadro clínico evidente.

Cuando aproximadamente quedan menos del 10-20% de los islotes funcionales, la hiperglucemia e hipoinsulinemia aparece acompañada de síntomas clínicos de la enfermedad (polidipsia, poliuria, polifagia, etc.) y el paciente se diagnostica de diabetes clínica, siendo necesario el tratamiento con insulina sustitutiva (fase de diabetes) <sup>[11]</sup>. En el momento del debut clínico, aproximadamente el 90% de los pacientes diabéticos tipo 1 tienen uno o más autoanticuerpos detectables en suero. Por esa razón, estos se utilizan como biomarcadores para diferenciarlos de la diabetes tipo 2 o de la diabetes monogénica (tipo MODY o neonatal) <sup>[8]</sup>.

## **2. DIABETES TIPO 2**

La diabetes tipo 2 (DM2), clásicamente conocida como diabetes no insulino dependiente, es una enfermedad poligénica debida a un cierto grado de resistencia a la acción de la insulina. Para intentar mantener el equilibrio, el organismo incrementa la secreción de insulina, lo cual acaba provocando un defecto funcional en las células beta pancreáticas <sup>[12]</sup>.

En adultos, este tipo de diabetes representa alrededor del 90% de todos los casos. Sin embargo, la DM2 es rara en edad pediátrica; aunque existen grandes diferencias de prevalencia entre etnias. En ciertas poblaciones como la afroamericana, la hispana y las nativas americanas, la DM2 puede llegar a ser tan frecuente en niños y adolescentes como la DM1. Por el contrario, en poblaciones caucásicas los casos pediátricos de DM2 son excepcionales <sup>[13]</sup>. Aun así, en las últimas dos décadas, esta enfermedad propia de adultos podría estar aumentando en edad pediátrica, de forma paralela al incremento de la obesidad <sup>[14]</sup>.

## **3. DIABETES MONOGENICA NO AUTOINMUNE**

La diabetes monogénica engloba todas aquellas formas raras de diabetes causadas por un defecto en un único gen, que provoca la disfunción de las células beta pancreáticas y afecta a la secreción o a la función de la insulina. A su vez, dentro de la diabetes monogénica pueden distinguirse: la diabetes tipo MODY (*maturity-onset diabetes of the young*), la diabetes neonatal y otras formas sindrómicas de diabetes <sup>[15]</sup>. A pesar de que la frecuencia de diabetes monogénica es muy baja en la población, se estima que cerca del 80% de los casos permanecen sin diagnosticar o son erróneamente clasificados como diabetes tipo 1 o tipo 2 <sup>[16]</sup>.

### **3.1. Diabetes tipo MODY**

La diabetes tipo MODY es la clase más común de diabetes monogénica, suponiendo al menos el 2% de todos los casos de diabetes en Europa <sup>[15]</sup>. Constituye un grupo clínica y genéticamente heterogéneo de desórdenes con un patrón de herencia autosómica dominante que, salvo que sea *de novo*, puede manifestarse a lo largo de varias generaciones. La mutación causante puede hallarse en diferentes genes, todos ellos relacionados con la diferenciación de la célula beta, con la secreción de la insulina o con su función <sup>[17]</sup>.

Hasta la fecha, se han definido al menos 14 subtipos de MODY en función del gen afectado. Tanto el cuadro clínico como la respuesta al tratamiento puede variar entre los distintos subtipos <sup>[18]</sup>. Además, la implementación de la tecnología de secuenciación masiva (*next-generation sequencing* o *NGS*) está permitiendo que continúen identificándose nuevos genes, dando lugar a la aparición de más subtipos <sup>[15]</sup>. Aun así, la gran mayoría de los casos son debidos a mutaciones en cuatro genes: el gen *GCK*, que codifica para la enzima glucoquinasa, y los genes *HNF1A*, *HNF4A* y *HNF1B*, que codifican para diferentes factores de transcripción.

De entre todos, el subtipo más común en población infantil es el MODY2 (o *GCK-MODY*). La enzima glucoquinasa actúa como sensor de glucosa en las células beta del páncreas. Por ello, mutaciones en heterocigosis que inactiven esta enzima elevan el umbral de glucosa requerido para liberar insulina, lo cual da lugar a una hiperglucemia moderada en ayunas, persistente y detectable desde el nacimiento. Sin embargo, los pacientes suelen ser asintomáticos y, con frecuencia, diagnosticados accidentalmente en análisis de rutina o durante el embarazo. No suelen precisar tratamiento, excepto en ciertas circunstancias, puesto que su hiperglucemia moderada no conlleva riesgo de complicaciones micro o macrovasculares <sup>[16]</sup>.

Otro subtipo habitual es el MODY3 (o *HNF1A-MODY*). El factor nuclear 1 $\alpha$  de hepatocito regula, entre otras funciones, la expresión génica de la insulina. Así, mutaciones en heterocigosis que impliquen pérdida de su función ocasionan una reducción en la secreción de insulina y una disfunción progresiva de las células beta pancreáticas. En este caso, los pacientes sí presentan síntomas y normalmente responden al tratamiento con sulfonilureas <sup>[17]</sup>.

Un fenotipo clínico similar se manifiesta en el subtipo MODY1 (o *HNF4A-MODY*), ya que el factor nuclear 4 $\alpha$  de hepatocito también guarda relación con las células beta y el transporte de glucosa. De igual manera, los pacientes responden a sulfonilureas <sup>[16]</sup>. Menos frecuente es el subtipo MODY5 (o *HNF1B-MODY*) que se caracteriza por la presencia de quistes renales además de diabetes. Esto se debe a que el factor nuclear 1 $\beta$  de hepatocito está involucrado en el desarrollo embrionario de la nefrona y del páncreas. Los pacientes requieren tratamiento con insulina <sup>[17]</sup>.

Otros subtipos más raros son aquellos originados por mutaciones heterocigotas en los genes: *PDX1/IPF1* (MODY4), *NEUROD1* (MODY6), *KLF11* (MODY7), *CEL* (MODY8), *PAX4* (MODY9), *INS* (MODY10), *BLK* (MODY11), *ABCC8* (MODY12), *KCNJ11* (MODY13) y *APPL1* (MODY14) <sup>[15]</sup>.

### **3.2. Diabetes neonatal**

La diabetes mellitus neonatal se define como aquella que aparece en los seis primeros meses después del nacimiento. Suele tener origen monogénico y puede ser permanente o transitoria (aunque es habitual que recidive durante la adolescencia) <sup>[19]</sup>.

La causa más común de diabetes neonatal permanente son mutaciones en uno de los dos genes que codifican para los canales de potasio dependientes de ATP (*K<sub>ATP</sub>*) presentes en la membrana de las células beta <sup>[20]</sup>. Estos canales de potasio constan de cuatro subunidades KIR6.2 (gen *KCNJ11*) y cuatro subunidades SUR1 (gen *ABCC8*).

Así pues, mutaciones activantes que impidan el cierre del canal, en último término afectan a la secreción de insulina. Dado que estos canales también se hallan en neuronas y músculo esquelético, además de diabetes los individuos suelen presentar un retraso del desarrollo psicomotor. Por este motivo, un diagnóstico temprano es de vital importancia, ya que el tratamiento con altas dosis de sulfonilureas no solo mejora la glucemia sino también el déficit neurológico [19].

Otra causa frecuente de diabetes neonatal permanente son defectos en el gen de la insulina (*INS*). Las mutaciones provocan un mal plegamiento de la proteína, lo cual afecta negativamente a su secreción. A largo plazo, estas alteraciones conducen a la muerte de células beta debido al aumento de estrés del retículo endoplasmático [20].

En el caso de la diabetes neonatal transitoria, las mutaciones en los genes *KCNJ11* y *ABCC8* constituyen la segunda causa más frecuente. La más habitual se debe a una sobreexpresión de la región cromosómica 6q24, por tres posibles mecanismos: una disomía uniparental del cromosoma 6, una duplicación del alelo paterno 6q24 o una pérdida de la metilación materna. Aunque estos pacientes responden a bajas dosis de insulina, se han descrito casos con buena respuesta a sulfonilureas [20].

En situaciones extremadamente raras, existen otros genes cuyas mutaciones pueden originar una diabetes neonatal. Por ejemplo, mutaciones en los genes *GATA6*, *GATA4*, *RFX6*, *PDX1/IPF1*, *NEUROD1*, *NEUROG3*, *EIF2AK3*, *GLIS3* o *ZFP57*, entre otros [19].

### **3.3. Diabetes sindrómicas**

Las formas sindrómicas de diabetes son raras y bastante complejas. Se trata de condiciones multisistémicas severas en las que la diabetes no siempre es la primera manifestación clínica. Algunos ejemplos son el síndrome de Wolfram, causado por mutaciones recesivas en el gen *WSF1*, o síndromes causados por alteraciones en el ADN mitocondrial como, por ejemplo, el síndrome de diabetes de herencia materna y sordera (MIDD) [21].

## **4. DIABETES MONOGÉNICA AUTOINMUNE**

Por norma general, la diabetes monogénica se caracteriza por no presentar autoinmunidad. Sin embargo, existe un pequeño número de condiciones monogénicas que sí provocan una diabetes autoinmune y, por tanto, en ese sentido son difíciles de distinguir de la diabetes tipo 1. En estos casos, la diabetes suele ir acompañada de otros trastornos autoinmunes sistémicos [22].

Normalmente, estas enfermedades autoinmunes sindrómicas aparecen en edades tempranas y dado que es posible que la primera manifestación clínica sea la diabetes, es sumamente necesario un diagnóstico apropiado que permita reconocerlas y tratarlas con prontitud, para paliar futuras complicaciones asociadas.

Los dos primeros genes que se conoció que podían desencadenar una diabetes monogénica autoinmune fueron el gen *AIRE* y el gen *FOXP3*. En los últimos años, gracias al avance de las tecnologías de secuenciación masiva (*NGS*), han podido identificarse nuevos genes responsables como: *IL2RA*, *LRBA*, *STAT3*, *STAT1*, *STAT5B*, *CTLA4* y *ITCH* [23].

El gen *AIRE* codifica para la proteína homónima de regulación autoinmune, cuya función es regular la expresión de antígenos propios específicos de tejido en el timo, para así educar a las células T *naive* durante el proceso de selección negativa de células T autorreactivas. Las mutaciones que conduzcan a la pérdida de función del gen *AIRE* impiden que las células T autorreactivas sean eliminadas, causando el síndrome poliendocrino autoinmune de tipo 1 (APS1). Este se caracteriza por: candidiasis crónica mucocutánea, hipoparatiroidismo e insuficiencia suprarrenal autoinmune. Además, un 13% de los individuos presentan diabetes [22].

El síndrome de inmunodesregulación-poliendocrinopatía-enteropatía ligada al cromosoma X (IPEX) es debido a mutaciones hemicigóticas en el gen *FOXP3*, que codifica un factor de transcripción clave para el desarrollo de las células T reguladoras. En su ausencia, se pierde la tolerancia periférica y el control de las células T autorreactivas. Dado que este gen se encuentra en el cromosoma X, una sola copia mutada provoca la enfermedad en varones; mientras que las mujeres son portadoras. Clínicamente, el síndrome aparece en periodo neonatal y las manifestaciones características son: enteropatía severa, diabetes autoinmune y habitualmente también afectación cutánea. Aun así, algunos casos muestran un fenotipo menos severo [24].

En esta línea, individuos con mutaciones recesivas en el gen *IL2RA* sufren el síndrome de la inmunodeficiencia 41 con linfoproliferación y autoinmunidad, con un cuadro clínico similar al IPEX (enteropatía, hipotiroidismo y eczema), que puede incluir diabetes autoinmune de aparición neonatal. El gen *IL2RA* codifica para la subunidad  $\alpha$  del receptor IL-2 (*IL2RA*) que se expresa en las células T reguladoras, facilitando su capacidad de reclutamiento y función supresora. A su vez, la molécula de señalización IL-2 está involucrada en la regulación inmune e induce la expresión de *FOXP3*. Por consiguiente, la deficiencia de *IL2RA* reduce la función supresora de las células T reguladoras y promueve la autoinmunidad a través de la pérdida de la tolerancia periférica [24].

Asimismo, el gen *LRBA* codifica para una proteína intracelular homónima que se expresa en las células B y T y juega un papel fundamental en la regulación postraducciona y circulación de la proteína *CTLA4*. Así pues, la inmunodeficiencia común variable 8 (CVID8) está causada por mutaciones recesivas de pérdida de función en *LRBA*. Estos defectos repercuten sobre la función inhibitoria de *CTLA4*, de manera que también disminuye la acción supresora de las células T reguladoras y se estimula el ataque autoinmune [22].

En cuanto a las proteínas codificadas por los genes *STAT3*, *STAT1* y *STAT5B*, se trata de factores de transcripción que intervienen en la respuesta celular a citoquinas y factores de crecimiento. Por ello, mutaciones de ganancia o de pérdida de función se han asociado a diversos desórdenes, que comprenden desde inmunodeficiencias primarias a enfermedades autoinmunes. Todo depende del tipo de alteración y de cómo se vean afectadas las otras rutas y procesos de señalización en los que la proteína mutada participa.

Por ejemplo, mutaciones de ganancia de función en *STAT1* provocan el síndrome de inmunodeficiencia 31C; en cambio, ese tipo de mutaciones en *STAT3* dan lugar a la enfermedad autoinmune multisistémica de inicio infantil. Por otro lado, mutaciones de pérdida de función en *STAT5B* se asocian a trastornos caracterizados por manifestaciones alérgicas o autoinmunes [25].

Otros síndromes de causa monogénica que cursan con diabetes autoinmune son: el síndrome autoinmune linfoproliferativo de tipo V, debido a mutaciones heterocigotas en el gen *CTLA4* [22]; y el síndrome autoinmune multisistémico con dismorfismo facial, originada por mutaciones recesivas en el gen *ITCH* [24].

En definitiva, cada una de estas formas de diabetes monogénica autoinmune (*Tabla 1*) tiene sus particularidades clínicas y de tratamiento, pero todas comparten la necesidad de un estudio genético para ser correctamente diagnosticadas.

*Tabla 1: Formas monogénicas de diabetes autoinmune.*

<b>Gen</b>	<b>Síndrome asociado</b>	<b>Modelo de herencia</b>
<i>AIRE</i> (21q22.3)	Síndrome poliendocrino autoinmune de tipo 1 (OMIM 240300)	Autosómico Recesivo/Dominante
<i>CTLA4</i> (2q33.2)	Síndrome autoinmune linfoproliferativo tipo V (OMIM 616100)	Autosómico Dominante
<i>FOXP3</i> (Xp11.3)	Síndrome de inmunodesregulación-poliendocrinopatía-enteropatía ligada al cromosoma X (OMIM 304790)	Ligado al cromosoma X
<i>IL2RA</i> (10p15.1)	Síndrome de la inmunodeficiencia 41 con linfoproliferación y autoinmunidad (OMIM 606367)	Autosómico Recesivo
<i>ITCH</i> (20q11.22)	Síndrome autoinmune multisistémico con dismorfismo facial (OMIM 613385)	Autosómico Recesivo
<i>LRBA</i> (4q31.3)	Síndrome de inmunodeficiencia común variable 8 (OMIM 614700)	Autosómico Recesivo
<i>STAT1</i> (2q32.2)	Síndrome de inmunodeficiencia 31C (OMIM 614162)	Autosómico Dominante
<i>STAT3</i> (17q21.2)	Síndrome autoinmune multisistémico de inicio infantil (OMIM 615952)	Autosómico Dominante
<i>STAT5B</i> (17q21.2)	Síndrome de Insensibilidad a la hormona del crecimiento con desregulación inmunitaria 1 y 2 (OMIM245590/618985)	Autosómico Recesivo/Dominante

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico de etiología muy diversa, caracterizado por una hiperglucemia crónica como consecuencia de una insuficiente secreción de insulina o una disminución de respuesta por parte de los tejidos. Los factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales, que intervienen en el desarrollo de cada tipo de diabetes son muy diferentes.

En pediatría, el 95% de los casos corresponden a una diabetes tipo 1 (DM1). Si bien esta enfermedad puede producirse a cualquier edad, a menudo se manifiesta antes de los 15 años (siendo más frecuente entre los 5-7 años de edad o cerca de la pubertad). Para su diagnóstico, además de la sintomatología clínica, se analizan biomarcadores como la presencia de autoanticuerpos circulantes en suero. Además, al tratarse de una enfermedad poligénica, no se asocia a una historia familiar de herencia autosómica dominante.

Otro tipo de diabetes presente con menor frecuencia en pediatría es la diabetes monogénica. Este grupo heterogéneo poco común es debido a alteraciones en un solo gen, que pueden afectar al desarrollo de la célula beta pancreática, a la síntesis de insulina o a su función. Aunque su característica principal es la ausencia de autoinmunidad, en los últimos años se han encontrado formas monogénicas de diabetes con autoinmunidad positiva. Así, estos casos raros son difíciles de diagnosticar dada la superposición con la clínica de DM1, que se caracteriza por la detección de autoinmunidad al debut de la enfermedad.

En este contexto, la **hipótesis del presente trabajo** es que **puede existir diabetes monogénica autoinmune en algunos casos pediátricos diagnosticados de DM1, especialmente cuando debutan a una edad inferior a los dos años, o cuando en su familia hay al menos tres generaciones de diabetes (herencia autosómica dominante)**. Además, se considera que **un estudio genético por secuenciación masiva puede ser una estrategia eficaz para la detección de variantes patogénicas relacionadas con la diabetes monogénica autoinmune**.

Este trabajo proporcionará una herramienta que ayudará a definir mejor la etiología de la diabetes en pediatría y permitirá a los pacientes beneficiarse del correcto diagnóstico de su enfermedad. Este aspecto es crucial para el control clínico, la elección terapéutica y el pronóstico, así como para el asesoramiento genético, cuando proceda.

El **objetivo principal** de este trabajo es determinar la presencia de diabetes monogénica autoinmune en pacientes pediátricos con diagnóstico de diabetes tipo 1 antes de los dos años de edad, o con una historia familiar de diabetes en al menos tres generaciones.

Para alcanzar este objetivo principal se plantearon los siguientes **objetivos operativos**:

1. Seleccionar a partir de una cohorte de más de 500 pacientes pediátricos diagnosticados de diabetes tipo 1 con estudio de autoinmunidad al debut clínico, aquellos que debutaron antes de los dos años de edad o que en su familia había al menos tres generaciones con diabetes.
2. Realizar un estudio genético mediante la tecnología de secuenciación masiva, a todos los casos seleccionados utilizando un panel de genes orientado al diagnóstico de diabetes monogénica.
3. Analizar las variantes candidatas a ser causantes de una forma monogénica de diabetes autoinmune. Verificar mediante secuenciación Sanger su autenticidad y la cosegregación con la clínica en la familia.

El estudio se realizó en el Grupo de Investigación en Genética y Control de Diabetes y Enfermedades Endocrinas de la UPV/EHU y del IIS Biocruces Bizkaia. A continuación, se describen los criterios aplicados para la selección de la cohorte y posteriormente se detalla la metodología molecular utilizada en el diagnóstico de la diabetes monogénica autoinmune, así como el proceso de filtrado de las variantes detectadas.

## 1. PACIENTES

Este proyecto forma parte de uno más amplio dirigido a definir la prevalencia de diabetes monogénica en población pediátrica diagnosticada de diabetes tipo 1. En un estudio previo, se definió la frecuencia de diabetes monogénica en diabetes tipo 1 con autoinmunidad negativa [26]. El presente trabajo se centró en el estudio de diabetes monogénica en niños y adolescentes con diabetes tipo 1 y autoinmunidad positiva.

De este modo, los pacientes incluidos en la presente investigación fueron seleccionados entre una serie de 500 niños, menores de 15 años, seguidos en ocho hospitales de referencia españoles [Hospitales: Cruces (Barakaldo), Vall d'Hebron (Barcelona), Son Espases (Mallorca), Miguel Servet (Zaragoza), Virgen del Rocío (Sevilla), Río Hortega (Valladolid), y La Paz y Severo Ochoa (Madrid)], que debutaron con diagnóstico de diabetes tipo 1 entre 2012 y la actualidad, y cuyas muestras y datos clínicos fueron remitidos a nuestro centro en el contexto de estos estudios.

Para formar parte del presente proyecto enfocado al diagnóstico de diabetes monogénica de tipo autoinmune, el requisito indispensable que debían cumplir los pacientes pediátricos era presentar diabetes con autoinmunidad, es decir, que al menos uno de los cuatro autoanticuerpos anti-islole analizados fuese positivo. Además, se establecieron otras dos condiciones no excluyentes: que en la familia hubiese tres o más generaciones con diabetes, o que el debut diabético fuese anterior a los 2 años de edad. Un total de 60 pacientes cumplían estos criterios, 27 niñas y 33 niños, y con un rango entre 9 meses y 14 años de edad al debut (*Tabla 2*).

*Tabla 2: Cohorte de pacientes.*

Subgrupo	Criterios	Número de pacientes
1	Tres generaciones con diabetes	17
2	Debut antes de los 2 años	37
3	criterio 1 + criterio 2	6

Respecto a los pacientes analizados (caso índice) se dispuso de una muestra de suero separado por centrifugación en el hospital de origen, y una muestra de sangre total en el momento del debut clínico de diabetes y antes de iniciar el tratamiento con insulina sustitutiva. Así mismo, se obtuvo muestra de sus progenitores. Estas muestras, congeladas a -80°C (suero) o a -40°C (sangre total) se usaron para la medición de autoanticuerpos (IAA, GADA, IA2A y ZnT8A) y para realizar el estudio genético, respectivamente.



La espectrofotometría se basa en la absorbancia de un compuesto presente en la solución frente a una longitud de onda determinada. De este modo, calcula la concentración de ADN teniendo en cuenta el valor de la absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Además, la relación de absorbancias A260/280 y A260/230 permite evaluar la pureza de la muestra. Cuando el valor del cociente A260/280 está comprendido entre 1,8 y 2,0 se considera que el ADN tiene una pureza óptima. Por el contrario, un valor inferior a 1,6 no es aceptable ya que indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas; mientras que un valor mayor de 2,1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. En cuanto al cociente A260/230, para ser dado por válido debe situarse alrededor de 1,5 y 2,2.

Alternativamente, la fluorometría presenta ventajas como una mayor sensibilidad y precisión. Se trata de un método basado en fluoróforos que se intercalan entre las moléculas de ADN de forma específica, lo cual minimiza los posibles errores debidos a sustancias contaminantes. Así, incluso cuando la concentración es muy baja, el fluorímetro *Qubit* proporciona mediciones de gran precisión; convirtiéndose en la opción preferida para aplicaciones como la secuenciación masiva o la PCR en tiempo real.

## **2.2. ESTUDIO GENÉTICO DE DIABETES MONOGENICA MEDIANTE NGS**

La identificación de posibles variantes patogénicas responsables de una diabetes monogénica autoinmune se llevó a cabo usando la tecnología de secuenciación masiva desarrollada por *Life Technologies*, actualmente *Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)* con las plataformas *Ion Torrent CHEF™* e *Ion GeneStudio S5 Plus™*. Al utilizar esta estrategia se consigue un alto rendimiento en el cribado de múltiples genes de forma simultánea y eficiente. La técnica consta de las siguientes etapas:

- Preparación de librerías: *Ion Ampliseq™ Library kit 2.0*.
- Amplificación clonal: *Ion Torrent CHEF™*.
- Secuenciación: *Ion GeneStudio S5 Plus™*.
- Procesamiento bioinformático de los datos generados: *Torrent™ Suite*.
- Interpretación de resultados y filtrado de variantes: *Ion Reporter™ Software*.

### **2.2.1. PANEL DE GENES:**

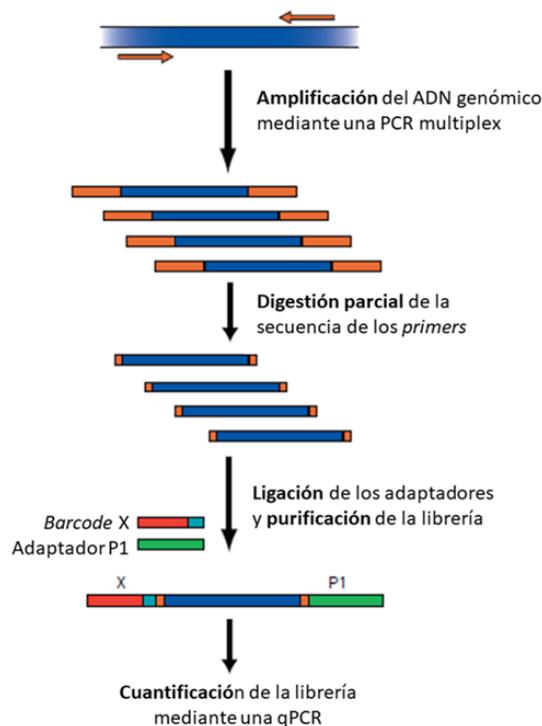
A lo largo de este proyecto se trabajó con un panel previamente diseñado en el laboratorio, que permite la secuenciación masiva de las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes, y las regiones *UTR* de 69 genes. Este panel incluía genes asociados a diabetes monogénica autoinmune (*AIRE*, *CTLA4*, *FOXP3*, *IL2RA*, *ITCH*, *LRBA*, *STAT1*, *STAT3* y *STAT5B*), además de otros relacionados con la diabetes monogénica no autoinmune (tanto *MODY* como neonatal).

Una característica de los paneles desarrollados por *Thermo Fisher Scientific* es que las parejas de *primers* se distribuyen en varios grupos o *pooles*. El motivo es evitar un solapamiento entre ellos que conduzca a la obtención de productos no deseados durante la amplificación de las regiones de interés. En concreto, este panel, diseñado por el Grupo de investigación a través de la herramienta *Ion AmpliSeq Designer tool*; consta de 2047 amplicones, de entre 125-375 pb, y los *primers* necesarios están separados en tres *pooles* distintos. El panel tiene un tamaño total de 531,67 kb y su cobertura teórica es del 99,86%.

### 2.2.2. PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS:

La preparación de la librería consiste en la amplificación múltiple y simultánea de las regiones genómicas de interés de los 69 genes integrados en el panel. Para realizar este proceso se utilizó el *Ion AmpliSeq library kit 2.0* siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, aunque con pequeñas modificaciones para mejorar el rendimiento. De forma resumida, los pasos a seguir fueron los siguientes (*Figura 3*):

- I. Amplificación del ADN genómico mediante PCR multiplex.
- II. Digestión parcial de la secuencia de los *primers*.
- III. Ligación de los adaptadores a los amplicones.
- IV. Purificación de la librería.
- V. Cuantificación del producto amplificado mediante una PCR cuantitativa (qPCR).



*Figura 3: Diagrama de las etapas que conlleva la preparación de librerías. Adaptado de Ion AmpliSeq™ DNA Library Preparation User Guide.*

## I. Amplificación del ADN genómico mediante PCR multiplex.

En cada librería se incluyeron 12 pacientes. Para cada muestra, el ADN genómico se diluyó a 5 ng/ $\mu$ L y se realizaron tres reacciones PCR (una para cada *pool* de *primers*) siguiendo los pasos:

- Preparar el mix de reactivos (5x *Ion Ampliseq<sup>TM</sup> HIFI Mix* + 2x *Ion Ampliseq<sup>TM</sup> Primer pool*).
- En hielo, añadir 7  $\mu$ L del *mix* + 3  $\mu$ L de ADN a cada tubo. Dar un pulso de centrifuga.
- Amplificar en el termociclador (*Veriti 96-well Thermal Cycler*).

## II. Digestión parcial de la secuencia de los *primers*.

Este paso supone la degradación de los *primers* unidos a los amplicones y resulta imprescindible para que mutaciones en las zonas de hibridación no queden enmascaradas al secuenciar. Consistió en:

- Juntar en un mismo tubo (por paciente) los amplicones obtenidos para cada *pool*; tomando 7  $\mu$ L *pool1* + 7  $\mu$ L *pool2* + 7  $\mu$ L *pool3*. Agitar con *vortex*.
- En hielo, se añadió a cada tubo 2  $\mu$ L del enzima *FuPa* y se incubó en el termociclador (*Veriti 96-well Thermal Cycler*).

## III. Ligación de adaptadores a los amplicones.

Esta parte del proceso implica la unión de dos fragmentos adaptadores a los extremos de los amplicones: el *Ion Xpress<sup>TM</sup> Barcode X* y el *Ion P1 Adapter*.

Al extremo 3' de los amplicones de cada individuo se incorpora un *Ion Xpress<sup>TM</sup> Barcode X* único (donde la X representa cualquier número comprendido entre 1 y 96). Los códigos de barras o *Barcodes* son unas secuencias específicas cortas de 6 a 14 nucleótidos que, tras la secuenciación, permiten identificar las lecturas pertenecientes a cada paciente incluido en la librería. Paralelamente, en el extremo 5' de todos los amplicones se une el *Ion P1 Adapter*, de 17 nucleótidos de longitud. El orden de actuación fue el siguiente:

- Preparar una dilución 1:4 de cada uno de los *Barcodes* necesarios.
- En hielo, se añadió a cada tubo 4  $\mu$ L de *Switch Solution* y 2  $\mu$ L del *Barcode-Adapter mix* correspondiente. Después de añadir 2  $\mu$ L de Ligasa y agitar con *vortex*, se amplificó en el termociclador (*Veriti 96-well Thermal Cycler*).

## IV. Purificación de la librería.

La purificación de la librería se realiza con el reactivo *NucleoMag NGS paramagnetic beads* que contiene bolas magnéticas a las que el ADN se une de forma reversible. Este fue el procedimiento:

- Trasvasar las muestras de la librería a tubos *Eppendorf Low Retention* de 1,5 mL.
- Añadir 45  $\mu$ L de *NucleoMag NGS* bien agitado a cada tubo.
- Incubar 5 min a temperatura ambiente. El ADN se pega a las bolas magnéticas.
- Colocar los tubos en la gradilla magnética *DynaMag<sup>TM</sup>-2 Magnet* e incubar 2 min. Las bolas se pegan a la pared del tubo.

- Se desechó el líquido sin mover las bolas y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%.
- Se eliminó el etanol y se repitió de nuevo este lavado. Tras eliminar el líquido, se dejó secar a temperatura ambiente 5 min y se transfirieron los tubos a la gradilla convencional.
- Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de *Low TE* y tras resuspender, se incubó 2-5 min a temperatura ambiente. El ADN se desprende de las bolas magnéticas.
- Se colocaron los tubos nuevamente en la gradilla magnética y se esperó unos 2 min, hasta que el líquido estuviera transparente. Después, se transvasó el líquido transparente de cada muestra a un *Eppendorf* nuevo y se desecharon las bolas magnéticas.

## V. Cuantificación de la librería mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Llegados a este punto y antes de proceder a la secuenciación, la reacción de PCR en tiempo real sirve para cuantificar la amplificación lograda. Esta técnica, realizada usando el *Ion Library TaqMan™ Quantitation kit*, se compone de las siguientes acciones:

- Preparar una dilución 1:100 de cada muestra de la librería a cuantificar.
- Preparar 3 diluciones seriadas 1:10 a partir de *E.coli DH10B Ion Control Library* (68 pM). Estas funcionan como control para elaborar una curva *standard* con 3 puntos de concentración conocida (6,8 pM, 0,68 pM y 0,068 pM).
- Preparar, teniendo en cuenta el número de muestras y controles, un mix con los reactivos: *2X Ion Library TaqMan® qPCR Mix* y *20x Ion Library TaqMan® Quantitation Assay*.
- En hielo, en una placa de 96 *AXYGEN*, se añadieron a cada pocillo 11  $\mu\text{L}$  del *mix* + 9  $\mu\text{L}$  de muestra diluida y se amplificó en el termociclador (*Real-Time PCR System 7300*). Cada muestra se midió por duplicado y se incluyeron 2 controles negativos.

Una vez obtenidos los resultados, se calculó la concentración de cada muestra de la librería (el rango suele situarse entre 100-500 pM). Seguidamente, se igualaron todas las concentraciones a 100 pM con *Low TE*. Por último, deben juntarse 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra (a 100 pM) en un solo tubo para posteriormente, proseguir con la amplificación clonal de la librería.

### 2.2.3. AMPLIFICACIÓN CLONAL DE LA LIBRERÍA:

Dado que la tecnología de secuenciación no es lo suficientemente sensible como para partir de una cantidad inicial de ADN amplificado reducida, es necesaria una etapa de clonación y enriquecimiento de la librería. De este modo, se generan muchas copias de cada fragmento de ADN unido a una *ISP (Ion Sphere™ Particles)* antes de secuenciar.

El proceso, que se llevó a cabo en el sistema integrado *Ion Torrent CHEF™* desarrollado por *Thermo Fisher Scientific*, consiste en: una PCR de emulsión, el posterior enriquecimiento de las *ISPs* clonales y su cuantificación. Cada una de estas fases tiene lugar en distintos módulos del equipo de forma completamente automatizada.

#### 2.2.4. SECUENCIACIÓN MASIVA:

La técnica de secuenciación masiva fue ejecutada con el secuenciador *Ion GeneStudio S5 Plus* de *Thermo Fisher Scientific*, cumpliendo el protocolo fijado por el fabricante y basado en la tecnología *Ion Torrent Proton™* (Figura 4).

Esta estrategia se fundamenta en un método de semiconducción iónica. Las *ISPs* procedentes de la amplificación clonal se depositan en un chip de secuenciación que tiene millones de pocillos y simultáneamente, en cada pocillo se produce una reacción de secuenciación. El chip cuenta con un sistema de detección electroquímica, de este modo, cada vez que la polimerasa incorpora un nuevo nucleótido a la cadena de ADN en síntesis, se libera un protón ( $H^+$ ) que modifica el pH de la solución. Esta variación de pH es detectada por un sensor de voltaje situado en cada micropocillo del chip que, unido a un sistema *ISFET* (*ion-sensitive field effect transistor*), emite una señal gráfica proporcional al número de nucleótidos añadidos. El secuenciador, gracias a un software que tiene incorporado, es capaz de asignarle una base nitrogenada a cada señal detectada durante la reacción de secuenciación.

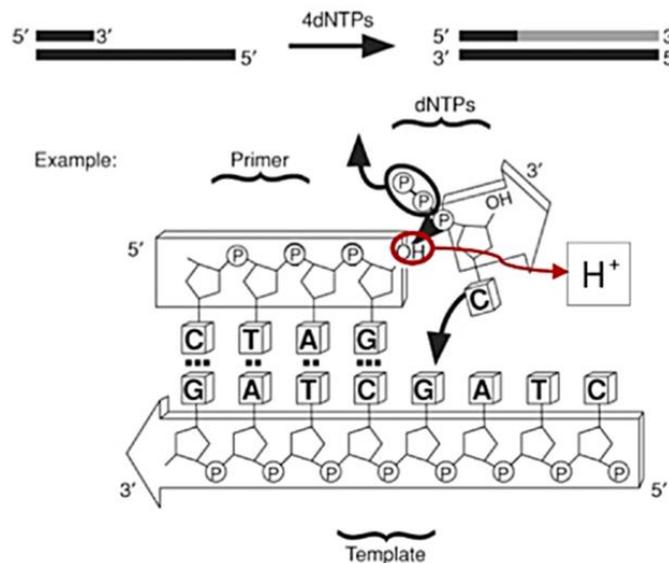


Figura 4: Reacción de secuenciación basada en la tecnología Ion Torrent Proton™.

#### 2.2.5. PROCESAMIENTO BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS:

El volumen masivo de datos que se genera aplicando la tecnología *NGS* a la clínica conlleva la necesidad de un tratamiento bioinformático que permita procesar e interpretar los resultados obtenidos. Para garantizar que este complejo análisis se configure con los parámetros más óptimos, se recurrió al *software* comercial de *Ion Torrent*, que divide la transformación de los datos en los siguientes apartados:

- Control de calidad (*Base quality scoring*)
- Alineamiento de las secuencias contra el genoma de referencia (*Alignment*)
- Detección de variantes (*Variant calling*)
- Anotación de variantes (*Annotation*)

El programa *Torrent Suite*<sup>TM</sup>, una vez finalizado el proceso de secuenciación, extrae las lecturas de cada muestra por separado, sin considerar los fragmentos adaptadores y excluyendo aquellas de baja calidad. Seguidamente, aplica el alineador *TMAP* (*Torrent Mapping Alignment Program*) sobre el conjunto de lecturas de buena calidad para alinearlas contra el genoma de referencia procedente de bases de datos actualizadas (*NCBI National Center for Biotechnology Information*).

En otras palabras, este paso consiste en establecer a qué posición, dentro del genoma de referencia, corresponde cada una de las lecturas. No obstante, debido a que el genoma humano tiene muchas zonas repetitivas y puede darse el caso de que una lectura encaje perfectamente en diferentes regiones, se usan algoritmos estadísticos para determinar cuál es la posición más acorde. Concluida la alineación, se crea un archivo BAM (.bam) que contiene todas las lecturas ordenadas por coordenada genómica.

Este archivo BAM se utiliza para ejecutar el *Torrent Variant Caller*, que compara nuevamente las lecturas alineadas con el genoma de referencia para encontrar aquellas posiciones donde exista una discrepancia. Si la misma diferencia se detecta en un número suficiente de lecturas como para descartar un error de secuenciación o de alineamiento, esta disparidad se considera una variante. Tras la identificación de variantes (*variant calling*) se elabora un archivo VCF (.vcf) con la recopilación de todas, aunque sin indicar con qué genes podrían coincidir esas localizaciones. Para conocer dicha información es necesario transferir los archivos BAM y VCF de cada muestra al software *Ion Reporter*<sup>TM</sup>. Así, además de la anotación de variantes, la plataforma *Ion Reporter*<sup>TM</sup> permite posteriormente filtrarlas en función de determinados parámetros y descargar un único archivo para cada muestra que puede abrirse con *Microsoft Excel* o similares.

### **2.2.6. FILTRADO E INTERPRETACIÓN DE VARIANTES:**

Las alteraciones encontradas al examinar la secuencia genética de un individuo pueden ser tanto cambios de un único nucleótido (*SNVs, single nucleotide variants*), como pequeñas inserciones/delecciones o variaciones en el número de copias (*CNVs, copy number variations*). Asimismo, la lista de variantes derivada del análisis bioinformático no solo contempla variantes potencialmente patogénicas sino también polimorfismos, variantes situadas en zonas intrónicas, errores de secuenciación, etc. Por ese motivo, es necesario un filtrado de los resultados.

A la hora de evaluar la patogenicidad de las variantes, el filtrado se estructuró en función de los siguientes aspectos:

#### **A) Frecuencia poblacional**

El primer filtro aplicado fue la frecuencia poblacional de las variantes. Los datos poblacionales se determinaron a partir de bases de datos genómicas públicas (*1000 Genomes Project, GnomAD y dbSNP*). De este modo, aquellas con una *MAF* > 0,01 (*minor allele frequency*) fueron excluidas por tener una frecuencia superior a lo esperado de acuerdo con la prevalencia de diabetes monogénica autoinmune. Por el contrario, una muy baja frecuencia o ausencia de registro en bases de datos poblacionales se tomó como posible indicador de su efecto nocivo.

## **B) Gen afectado, Posición genómica y Tipo de variante**

Una vez restringido el estudio a variantes raras ( $MAF \leq 0,01$ ), primero se tuvo en cuenta cuál era el gen afectado, ya que ello sugiere con qué enfermedad podría estar relacionada esa alteración. Ante todo, se priorizaron aquellas variantes situadas en genes ligados a diabetes monogénica autoinmune. De forma puntual, también se contemplaron algunos casos en los principales genes responsables de diabetes de tipo MODY o neonatal.

Seguidamente, se valoró la posición genómica de la variante, es decir, si se encontraba en una región exónica, intrónica o en una zona de *splicing*, puesto que su efecto patogénico es diferente. Un cambio en una región intrónica, a pesar de que quizá la unión de factores de transcripción u otros elementos reguladores pueda verse afectada, probablemente tenga menor repercusión, porque esa parte de la secuencia genética no se transcribe a ARNm. Por el contrario, una alteración en una zona de *splicing* puede suponer una modificación significativa del tamaño o la funcionalidad de la proteína resultante. En el caso de las variantes situadas en regiones exónicas (codificantes) hay que fijarse en el impacto sobre la pauta de lectura. Por ejemplo, una variante de tipo sinónimo (mismo aminoácido) posiblemente no tenga tanta trascendencia como una variante *missense* (cambio de aminoácido), una *nonsense* (codón de stop prematuro) o una inserción/delección que desplace toda la pauta de lectura.

Otro factor en el que se reparó fue la profundidad de lectura de las variantes. Un cambio que no supera el umbral mínimo de lecturas ( $> 20$ ) podría no ser real, sino debido a un error durante el proceso de secuenciación. Por tanto, las variantes de interés que no superaban este umbral fueron analizadas por Sanger.

## **C) Bases de datos y Softwares de predicción**

Para completar la valoración de la patogenicidad cada una de las variantes, se consultó si existían otros casos descritos en bases de datos de enfermedades, como *Human Gene Mutation Database (HGMD)* y *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*, o en la literatura (*PubMed*).

De forma adicional, en especial para aquellos cambios no registrados, se usaron varios *softwares* de predicción, dependiendo del tipo de variante. Así, para las *missense* se utilizaron: *PolyPhen2*, *PROVEAN*, *SIFT*, *PANTHER*, *MutationTaster* y *SNPs&GO*; mientras que para las variantes de *splicing* se recurrió a *VarSeak* o a *Human Splicing Finder*. En todos los casos se consultó también la interpretación de *VarSome*.

## **D) Confirmación y Segregación en la familia**

En último término, la existencia de aquellas variantes detectadas con sospecha de ser probablemente patogénicas, debía ser verificada en el paciente (índice) pertinente. Además, para determinar si ese cambio había sido heredado de alguno de los progenitores, en cada caso se realizó un nuevo análisis con los tres miembros (índice, madre y padre). Esta comprobación consistió en amplificar por PCR convencional únicamente la región del gen donde se encontraba la alteración para después proceder a la secuenciación tradicional por el método de Sanger.

La técnica de Sanger se basa en la incorporación de dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) a la reacción de secuenciación. Estos análogos químicos de los cuatro nucleótidos del ADN se caracterizan por carecer del grupo hidroxilo en 3' requerido para la extensión de la cadena que se está polimerizando en dirección 5' → 3'. De este modo, cuando a la cadena de ADN en síntesis se adiciona uno de estos cuatro *ddNTPs*, se para la reacción. Así se generan fragmentos de diferente tamaño que luego se separan a través de un polímero. Dado que cada *ddNTP* está marcado fluorescentemente de un color distinto, es posible saber cuál se ha unido e ir determinando la secuencia genética. Este proceso se ejecutó utilizando el equipo *ABI3500 Genetic Analyzer*, de *Thermo Fisher Scientific*.

Los datos clínicos del portador y la segregación de la variante en los individuos enfermos de la familia, así como la comparación de la relación genotipo-fenotipo con otros casos descritos en la literatura, permitió finalizar el filtrado de las variantes.

En función de todos estos parámetros, las variantes fueron clasificadas en una de las cinco categorías que estipula el Colegio Americano de Genética Médica (*ACMG*): patogénica, probablemente patogénica, significado incierto (*VUS*, del inglés *variant of uncertain significance*), probablemente benigna y benigna.

### **3. ASPECTOS ÉTICOS**

Para los estudios genéticos se obtuvo consentimiento informado de los pacientes y sus familias. El estudio tuvo el visto bueno del Comité de Ética en Investigación Clínica de Euskadi (PI2017135).

En este apartado se presentan los resultados obtenidos tras el análisis genético. De los casos incluidos en la base de datos de pacientes con diagnóstico de diabetes tipo 1 por presentar autoinmunidad positiva al inicio clínico de la enfermedad, 60 niños cumplían al menos uno de los dos criterios previamente definidos: que en la familia hubiese tres o más generaciones con diabetes, o que el debut diabético se hubiese producido antes de los dos años de edad.

A la hora de interpretar los resultados de las variantes, se siguió el proceso de filtrado explicado en la sección *Metodología*, resumido en un diagrama de flujo al final del apartado (*Figura 5*).

### **A) Frecuencia poblacional:**

El resultado del estudio genético fue una media de 450 variantes/paciente. Tras aplicar como primer filtro  $MAF \leq 0,01$  este número se redujo a una media de 50-60 variantes detectadas para cada individuo estudiado.

### **B) Gen, Posición y Tipo de variante:**

Posteriormente, cada uno de estos cambios fue evaluado de manera minuciosa considerando otros aspectos como el gen en el que se localiza la variante, la posición genómica y el tipo de variante. De este modo, el número de variantes de interés quedó reducido a un total de 45 en 30 pacientes.

### **C) Bases de datos y Softwares de predicción:**

A continuación, se procedió a consultar si estos cambios aparecían descritos en las bases de datos (*HGMD* y *OMIM*) o en la literatura (*PubMed*). Sumado a ello, se utilizaron diversos *softwares* de predicción, lo que permitió descartar todas aquellas variantes que fueron valoradas como benignas o probablemente benignas. En base a los resultados obtenidos en este punto, se seleccionaron 14 variantes potencialmente candidatas, presentes en 12 familias no emparentadas entre sí (*Tabla 3*).

### **D) Confirmación y Segregación en la familia:**

Cada una de estas 14 variantes fue analizada por el método de secuenciación Sanger para confirmar que se trataba de variantes reales y no un artefacto de la *NGS*. Además, se estudiaron ambos progenitores para determinar si el cambio había sido heredado de alguno de ellos o se había producido *de novo*. A pesar de confirmarse por Sanger que todas las variantes eran reales, gran parte de ellas resultaron heredadas de un progenitor asintomático (*Tabla 3*). Las variantes que no cosegregaban con la clínica de la familia no se tuvieron en cuenta.

Tabla 3: Resultados de los softwares de predicción y la segregación familiar de las variantes seleccionadas.

Familia	Gen	Variante detectada	VarSome	PROVEAN	SIFT	PolyPhen	Panther	Mutation TASTER	SNPSGO	VarSeak	Human Splicing Finder	Pro y genitor portador
1	ABCC8	c.853C>T p.Arg285Trp	VUS	neutral	deleterious	possibly damaging	probably benign	disease causing	disease effect	-	-	padre asintomático
2	HNF1A	c.481G>A p.Ala161Thr	VUS	deleterious	deleterious	probably damaging	probably damaging	disease causing	disease effect	-	-	madre asintomática
3	LRBA	c.8548C>T p.Arg2850Cys	VUS	deleterious	deleterious	probably damaging	-	disease causing	neutral	-	-	madre asintomática
4	INSR	c.2354C>G p.Ser785Trp	Likely pathogenic	deleterious	deleterious	neutral	possibly damaging	disease causing	disease effect	-	-	madre no portadora, sin muestra de padre
5	STAT5B	c.286-12_290del	Pathogenic	-	-	-	-	-	-	splicing effect	splicing effect	variante presente solo en paciente índice
6	LRBA	c.607C>T p.Pro203Ser	VUS	deleterious	deleterious	probably damaging	-	disease causing	neutral	-	-	padre asintomático
7	LRBA	c.4591T>G p.Phe1531Val	VUS	deleterious	deleterious	probably damaging	-	disease causing	neutral	-	-	padre asintomático
8	FOXP3	c.-22-2delA	Pathogenic	-	-	-	-	-	-	splicing effect	splicing effect	madre portadora
9	BLK	c.713G>A p.Arg238Gln	Likely benign	deleterious	deleterious	probably damaging	probably damaging	disease causing	neutral	-	-	padre asintomático
	INSR	c.3080G>A p.Arg1027Gln	Likely pathogenic	deleterious	deleterious	possibly damaging	probably damaging	disease causing	disease effect	-	-	madre asintomática
10	AIRE	c.718G>C p.Gly240Arg	Likely benign	deleterious	deleterious	possibly damaging	probably benign	neutral	-	-	-	padre asintomático
11	KCNJ11	c.719T>G p.Met240Arg	VUS	deleterious	deleterious	neutral	probably damaging	disease causing	disease effect	-	-	padre con diabetes
	LRBA	c.2164C>T p.Arg722Cys	Likely pathogenic	deleterious	deleterious	neutral	-	disease causing	neutral	-	-	madre asintomática
12	LRBA	c.584A>C p.Lys195Thr	VUS	deleterious	deleterious	possibly damaging	-	disease causing	neutral	-	-	madre con diabetes

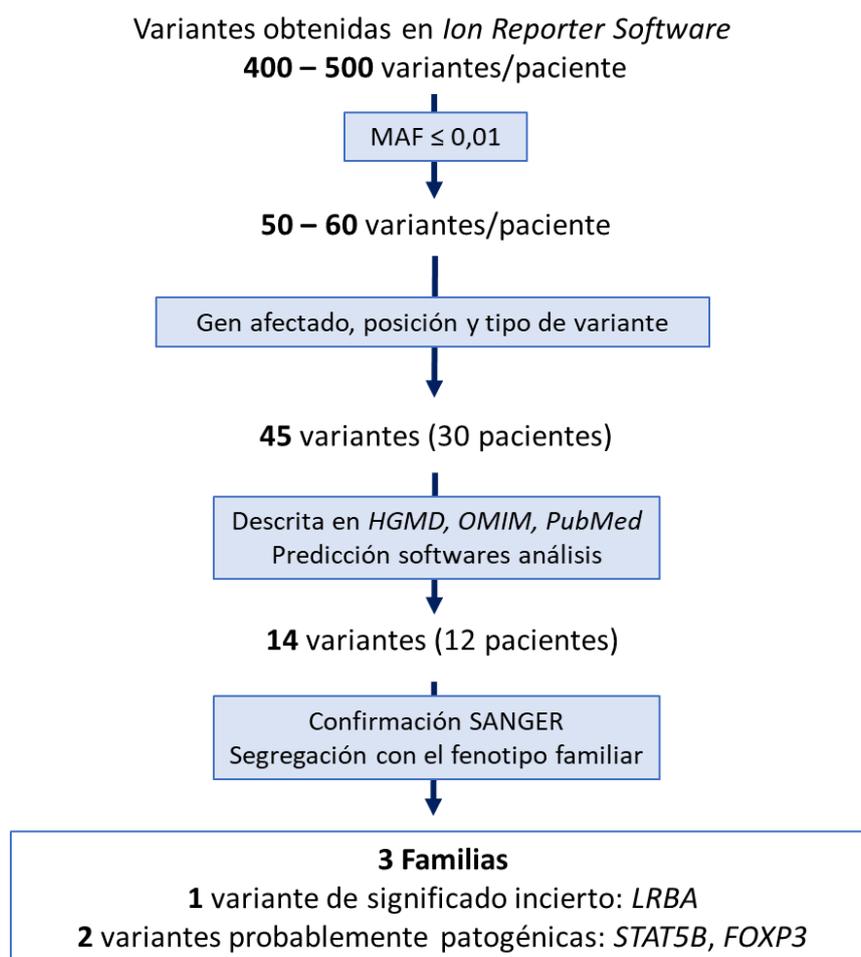
Transcritos de referencia: ABCC8 (NM\_000352), HNF1A (NM\_000545), LRBA (NM\_001199282), INSR (NM\_000208), STAT5B (NM\_012448), FOXP3 (NM\_014009), BLK (NM\_001715), AIRE (NM\_000383), KCNJ11 (NM\_000525).

Atendiendo exclusivamente a las variantes confirmadas que cosegregan con la clínica familiar y que se encuentran en genes asociados a diabetes monogénica autoinmune, la clasificación final se refleja en la *Tabla 4*:

*Tabla 4: Clasificación de las variantes de acuerdo con las categorías de la ACMG.*

<u>Familia</u>	<u>Gen</u>	<u>Variante detectada</u>	<u>Clasificación</u>	<u>Edad al debut</u>	<u>Generaciones con diabetes</u>
5	STAT5B	c.286-12_290del	probablemente patogénica	13 meses	1
8	FOXP3	c.-22-2delA	probablemente patogénica	9 meses	4
12	LRBA	p.Lys195Thr	VUS (significado incierto)	12 años	3

A continuación, se esquematiza el proceso de filtrado mediante un diagrama de flujo:



*Figura 5: Diagrama de flujo que resume el proceso de filtrado de variantes.*

En los últimos años se han descrito formas monogénicas de diabetes autoinmune que se pueden superponer clínicamente con la diabetes tipo 1 (DM1), debido a que comparten características clínicas, la dependencia de insulina y la presencia de autoinmunidad positiva. Sin embargo, la etiopatogenia, la evolución y el tratamiento de cada enfermedad son diferentes.

Gran parte de los casos de diabetes monogénica autoinmune todavía permanecen sin identificar y se clasifican erróneamente como DM1. Por esa razón, un correcto diagnóstico del tipo de diabetes mediante un estudio genético es esencial tanto para seguimiento del paciente como para su tratamiento e incluso, para proporcionar un adecuado consejo genético [27].

Estudios recientes han identificado nuevas variantes en genes asociados a diabetes monogénica autoinmune en pacientes que, además de diabetes, manifestaban otros desórdenes autoinmunes [23][28]. No obstante, la existencia de casos de diabetes monogénica autoinmune en pacientes diagnosticados solo de DM1 no ha sido estudiada en profundidad.

Así, en el presente proyecto se quiso determinar mediante un estudio genético por secuenciación masiva, la presencia de diabetes monogénica autoinmune en una población de pacientes pediátricos con autoinmunidad positiva que, o bien debutaron antes de los dos años de edad o bien, en la familia había al menos tres generaciones con diabetes.

Tras el análisis genético de los 60 pacientes que cumplían los criterios indicados, al menos tres variantes fueron seleccionadas como posibles responsables de una diabetes monogénica autoinmune.

La primera variante probablemente patogénica identificada fue localizada en el gen **STAT5B**. Este gen, constituido por 19 exones, codifica para una proteína citosólica que interviene en la transducción de la señal en respuesta a determinadas citoquinas y a la hormona del crecimiento. Paralelamente, también juega un papel esencial en la generación de algunas células T reguladoras, por lo que cada vez se sugiere con mayor convicción que **STAT5B** guarde relación con la diabetes [29].

La variante (**c.286-12\_290del**) del gen **STAT5B** consiste en una delección de 17 nucleótidos que afecta a la región aceptora de *splicing* del exón 4 y a los cuatro primeros nucleótidos del mismo. Los *softwares* de predicción estimaron el cambio como patogénico, aunque no se haya reportado con anterioridad en la literatura. En cuanto al paciente, se trataba de un niño que debutó con clínica de diabetes tipo 1 a los 13 meses de edad y no presentaba otros trastornos autoinmunes.

El estudio genético de los progenitores demostró que la variante no había sido heredada de ninguno de ellos; por tanto, se trataría de una mutación *de novo*. Por su localización, de acuerdo con la estructura proteica [30], este cambio estaría afectando al extremo N-terminal y podría modificar el plegamiento de la proteína. En consecuencia, podría tener un impacto sobre las rutas derivadas y conducir a una desregulación del sistema inmune y a la aparición de diabetes.

Estudios llevados a cabo en ratones diabéticos no obesos demuestran que una sobreexpresión de *STAT5B* otorga un efecto protector frente al desarrollo de diabetes tipo 1. En cambio, no existe aún ninguna evidencia de que su defecto pueda relacionarse directamente con la aparición de diabetes autoinmune [29].

Por el momento, la mayoría de mutaciones heterocigotas en *STAT5B* descritas en la literatura se caracterizan por una moderada insensibilidad a la hormona del crecimiento, eczemas y una concentración elevada de inmunoglobulinas E (IgE) [31]. En homocigosis, el fenotipo es todavía más severo, ocasionando una inmunodeficiencia primaria, relacionada con una disfunción de las células T reguladoras, y otras enfermedades pulmonares asociadas. Contrariamente, también se han reportado algunos casos de mutaciones que provocan una disfunción inmune moderada; entre ellos, un paciente con tiroiditis autoinmune que a los 20 años fue diagnosticado de celiaquía [32].

A día de hoy muchos aspectos de la función de este gen dentro del sistema inmune siguen siendo desconocidos. Los resultados obtenidos no permiten saber hasta qué punto la variante detectada puede alterar la funcionalidad de la proteína. Para comprobar la implicación de este cambio en el desarrollo de la diabetes del paciente sería necesario realizar estudios funcionales.

La segunda variante probablemente patogénica detectada se encontró en el gen ***FOXP3***. Este gen está ubicado en el centrómero del cromosoma X y consta de 12 exones, el primero de ellos (no codificante) situado en la región 5' *UTR*. La expresión génica de *FOXP3* está regulada por modificaciones epigenéticas en varias secuencias conservadas no codificantes localizadas en la región promotora y en el primer y segundo intrón [33]. En cuanto a su función, *FOXP3* es un factor de transcripción clave para el desarrollo, mantenimiento y función de las células T reguladoras.

En varones, mutaciones hemicingóticas de pérdida de función en este gen pueden desencadenar el síndrome IPEX, debido a la pérdida de tolerancia periférica y el descontrol de la respuesta inmune. Este raro desorden se caracteriza principalmente por una enteropatía severa, una diabetes autoinmune de aparición temprana y una dermatitis crónica, además de otras posibles condiciones autoinmunes [34]. Sin embargo, la expresión fenotípica de los individuos puede ser muy variada porque no todas las mutaciones producen el mismo impacto. Prueba de ello es un estudio publicado en 2018 que recoge distintas variantes identificadas en pacientes con un cuadro autoinmune leve, presentando diabetes autoinmune sin apenas otras manifestaciones clínicas [35].

La variante (**c.-22-2delA**) del gen *FOXP3* hallada en este trabajo consiste en la delección de una adenina situada en la posición aceptora de *splicing* de la región 5' *UTR*. Diferentes *softwares* de predicción pronostican una pérdida de este aceptor e investigaciones recientes han encontrado otras alteraciones en la posición donadora de la misma región que interfieren en la expresión del gen y en la producción normal de proteína. Además, se ha descrito que mutaciones en esta zona de *splicing* pueden producir un fenotipo atípico y atenuado del síndrome IPEX [36].

El paciente, un niño que debutó clínicamente a los 9 meses de edad, hereda esta variante de su madre, que es portadora en heterocigosis. De igual manera que en el caso de la variante anterior, se requieren estudios funcionales para determinar la repercusión que este cambio puede tener sobre la proteína. Adicionalmente, sería interesante estudiar a otros miembros de la familia, por ejemplo, los hermanos sanos y afectados de la madre, con el fin de averiguar si ellos también presentan la variante.

La última de las variantes relacionada con formas monogénicas de diabetes autoinmune, fue encontrada en el gen **LRBA** y se clasificó como variante de significado incierto (*VUS*). Este gen está constituido por 57 exones que codifican para una proteína citosólica homónima. Una de sus funciones esenciales es actuar como regulador postraducciona de CTLA4. Éste, a su vez, es un inhibidor de la respuesta inmune, implicado en la supresión de las células T reguladoras. Por tanto, la pérdida de función de LRBA conlleva una mayor degradación de CTLA4, que desemboca en una alteración de la tolerancia y una activación incontrolada del sistema inmune [37].

En un principio, mutaciones en este gen se asociaron a la inmunodeficiencia común variable 8 (CVID8), pero en los últimos años se ha observado que el defecto de LRBA puede causar un amplio espectro de fenotipos. Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes se incluyen diarrea crónica, infecciones recurrentes, organomegalia y desórdenes autoinmunes como diabetes, tiroiditis o anemia hemolítica [38].

La mayoría de casos descritos en la literatura que se deben a mutaciones bialélicas en el gen **LRBA**, cursan con diabetes autoinmune de aparición temprana. A pesar de que los individuos habitualmente presentan también otros trastornos, se han reportado al menos dos situaciones en las cuales la diabetes autoinmune era la única enfermedad que manifestaban los pacientes. En un caso se trataba de una niña con una mutación en homocigosis que debutó con diabetes a los 9 meses y seguía sin haber desarrollado otras anomalías a los 2 años de edad [37]. El otro caso hace referencia a un niño diagnosticado de diabetes a los 6 meses de edad en el que se detectó una mutación en heterocigosis compuesta y que, a los 3 años, no mostraba otras manifestaciones [39].

La variante detectada en el gen **LRBA** consiste en la sustitución de una adenina por una citosina, lo cual implica un cambio puntual de aminoácido (**p.Lys195Thr**). Esta variante, que no aparece reportada en la bibliografía, fue valorada como probablemente patogénica por algunos *softwares* de predicción; mientras que otros como *VarSome* la consideraron de significado incierto (*VUS*).

El cambio lo presentan madre e hijo en heterocigosis. No obstante, los resultados actuales no permiten esclarecer si esta variante podría ser la causa de la diabetes que ambos padecen. Tampoco puede descartarse que esta alteración tenga un cierto efecto promotor de la autoinmunidad, ya que la madre debutó a los 9 meses y el hijo, aunque con un debut más tardío, sufre hipotiroidismo autoinmune primario. Así pues, en primer lugar, sería conveniente estudiar a otros miembros de la familia, tanto sanos como afectados, y examinar cómo cosegrega la variante en ellos. Además, por otro lado, habría que plantear estudios funcionales para determinar cómo repercute esta variante en la funcionalidad de la proteína LRBA.

En cualquier caso, es importante mencionar que la clasificación de una variante nunca es definitiva. A medida que pase el tiempo pueden aparecer nuevos estudios que, o bien respalden la valoración adjudicada, o bien demuestren que la frecuencia poblacional de ese cambio es mayor de lo que se creía años atrás y, por tanto, la variante deba ser recategorizada.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que en al menos un 3% (2/60) de los casos estudiados con diabetes autoinmune, se encontró una variante probablemente patogénica en heterocigosis que podría ser la causa de la diabetes en la familia.

Es cierto que estudios anteriores con un planteamiento similar detectaron un mayor número de variantes potencialmente candidatas a ser responsables de la enfermedad (4/18). Sin embargo, estos investigadores optaron por seleccionar un grupo de individuos que no presentaban únicamente diabetes con autoinmunidad positiva, sino que además manifestaban importantes desregulaciones autoinmunes en otros órganos o sistemas. Este cuadro clínico más severo y de carácter sindrómico elevaba de manera considerable las posibilidades de que se tratase de una forma rara de diabetes monogénica autoinmune <sup>[23][28]</sup>. Por el contrario, la cohorte seleccionada para el presente trabajo se caracterizaba por presentar diabetes con autoinmunidad positiva de forma aislada. Esta diferencia básica en los criterios establecidos para la selección de pacientes puede ser la razón por la cual ellos hallaron un porcentaje más elevado de cambios.

No obstante, debe tenerse en cuenta que la diabetes autoinmune puede ser la primera manifestación clínica y que posteriormente, aparezcan otras condiciones autoinmunes. En consecuencia, el presente proyecto abre el camino para no descartar diabetes monogénica autoinmune en pacientes diagnosticados únicamente con clínica de diabetes tipo 1, en etapas jóvenes de la vida o con varias generaciones afectas de la enfermedad.

Por otro lado, en pacientes con diabetes tipo 1 debería implementarse como rutina el seguimiento de otros parámetros autoinmunes en distintos órganos, ya que, en caso de detectarse, conduciría a plantear la existencia de este tipo de formas monogénicas. De hecho, cabe la posibilidad de que un seguimiento minucioso de estas familias permita reconocer otros trastornos autoinmunes de aparición más tardía.

En resumen, este trabajo evidencia que en pacientes con diabetes tipo 1 aislada diagnosticados antes de los dos años, o con varias generaciones afectas; habría que descartar, si se dispone de tecnología adecuada, la presencia de un trastorno monogénico. Además, en caso de identificarse, ello implicará un apropiado seguimiento y control de su enfermedad, y un tratamiento más individualizado, así como un adecuado consejo genético cuando sea necesario.

Las conclusiones del presente estudio son:

- Existen casos de diabetes monogénica autoinmune no diagnosticada entre pacientes pediátricos con debut de diabetes tipo 1 antes de los dos años de edad, o con historia familiar de diabetes en al menos tres generaciones.
- La presencia de autoinmunidad positiva no siempre excluye una forma monogénica de diabetes. Tanto la edad temprana al diagnóstico como varias generaciones con diabetes en la familia, son posibles indicadores a tener en cuenta para sospechar de una forma monogénica de la enfermedad.
- La secuenciación masiva es una herramienta eficaz para el diagnóstico de diabetes monogénica que permitirá a los pacientes beneficiarse del diagnóstico correcto de su enfermedad, aspecto crucial para el control clínico y asesoramiento genético.

1. Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019;127(Suppl 1):S1-S7. doi:10.1055/a-1018-9078
2. Care D, Suppl SS. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021;44(January):S15-S33. doi:10.2337/dc21-S002
3. Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes*. 2018;42:S10-S15. doi:10.1016/j.jcjd.2017.10.003
4. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(11):635-650. doi:10.1038/s41574-019-0254-y
5. von Scholten BJ, Kreiner FF, Gough SCL, von Herrath M. Current and future therapies for type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2021;64(5):1037-1048. doi:10.1007/s00125-021-05398-3
6. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:1-18. doi:10.1038/nrdp.2017.16
7. Nucci AM, Virtanen SM, Cuthbertson D, et al. Growth and development of islet autoimmunity and type 1 diabetes in children genetically at risk Pathway to Prevention. Published online 2021:826-835.
8. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69-82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7
9. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-2462. doi:10.1016/S0140-6736(18)31320-5
10. Infante M, Ricordi C, Sanchez J, et al. Influence of vitamin D on islet autoimmunity and beta-cell function in type 1 diabetes. *Nutrients*. 2019;11(9):1-30. doi:10.3390/nu11092173
11. Cabello-Olmo M, Araña M, Radichev I, Smith P, Huarte E, Barajas M. New insights into immunotherapy strategies for treating autoimmune diabetes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):1-26. doi:10.3390/ijms20194789
12. Rubio Cabezas Ó, Argente J. Diabetes mellitus: formas de presentación clínica y diagnóstico diferencial de la hiperglucemia en la infancia y adolescencia. *An Pediatr*. 2012;77(5):344.e1-344.e16. doi:10.1016/j.anpedi.2012.06.013
13. Barrett T, Jalaludin MY, et al. Rapid progression of type 2 diabetes and related complications in children and young people—A literature review. *Pediatr Diabetes*. 2020;21(2):158-172. doi:10.1111/pedi.12953
14. Shah AS, Nadeau KJ. The changing face of paediatric diabetes. *Diabetologia*. 2020;63(4):683-691. doi:10.1007/s00125-019-05075-6
15. Aarthy R, Aston-Mourney K, Mikocka-Walus A, et al. Clinical features, complications and treatment of rarer forms of maturity-onset diabetes of the young (MODY) - A review. *J Diabetes Complications*. 2021;35(1):107640. doi:10.1016/j.jdiacomp.2020.107640
16. Riddle MC, Philipson LH, Rich SS, et al. Monogenic diabetes: From genetic insights to population-based precision in care. reflections from a diabetes care editors' expert forum. *Diabetes Care*. 2020;43(12):3117-3128. doi:10.2337/dci20-0065
17. Firdous P, Nissar K, Ali S, et al. Genetic testing of maturity-onset diabetes of the young current status and future perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(MAY). doi:10.3389/fendo.2018.00253
18. Vaxillaire M, Froguel P. Monogenic diabetes: Implementation of translational genomic research towards precision medicine. *J Diabetes*. 2016;8(6):782-795. doi:10.1111/1753-0407.12446
19. Barbetti F, D'Annunzio G. Genetic causes and treatment of neonatal diabetes and early childhood diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018;32(4):575-591. doi:10.1016/j.beem.2018.06.008
20. Lemelman MB, Letourneau L, Greeley SAW. Neonatal Diabetes Mellitus: An Update on Diagnosis and Management. *Clin Perinatol*. 2018;45(1):41-59. doi:10.1016/j.clp.2017.10.006

21. Sanyoura M, Philipson LH, Naylor R. Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options. *Curr Diab Rep*. 2018;18(8):1-13. doi:10.1007/s11892-018-1024-2
22. Johnson MB, Cerosaletti K, Flanagan SE, Buckner JH. Genetic Mechanisms Highlight Shared Pathways for the Pathogenesis of Polygenic Type 1 Diabetes and Monogenic Autoimmune Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019;19(5):1-9. doi:10.1007/s11892-019-1141-6
23. Strakova V, Elblova L, Johnson MB, et al. Screening of monogenic autoimmune diabetes among children with type 1 diabetes and multiple autoimmune diseases: Is it worth doing? *J Pediatr Endocrinol Metab*. Published online 2019:1-7. doi:10.1515/jpem-2019-0261
24. Johnson MB, Hattersley AT, Flanagan SE. Monogenic autoimmune diseases of the endocrine system. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(10):862-872. doi:10.1016/S2213-8587(16)30095-X
25. Lorenzini T, Dotta L, et al. STAT mutations as program switchers: turning primary immunodeficiencies into autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2017;101(1):29-38. doi:10.1189/jlb.5ri0516-237rr
26. Urrutia I, Martínez R, Rica I, et al. Negative autoimmunity in a Spanish pediatric cohort suspected of type 1 diabetes, could it be monogenic diabetes? *PLoS One*. 2019;14(7):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0220634
27. Harris AG, Letourneau LR, Greeley SAW. Monogenic diabetes: The impact of making the right diagnosis. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(4):558-567. doi:10.1097/MOP.0000000000000643
28. Johnson MB, Patel KA, De Franco E, et al. A type 1 diabetes genetic risk score can discriminate monogenic autoimmunity with diabetes from early-onset clustering of polygenic autoimmunity with diabetes. *Diabetologia*. 2018;61(4):862-869. doi:10.1007/s00125-018-4551-0
29. Fabbri M, Frixou M, Degano M, Foustero G. Type 1 diabetes in STAT protein family mutations: Regulating the Th17/Treg equilibrium and beyond. *Diabetes*. 2019;68(2):258-265. doi:10.2337/db18-0627
30. Hwa V, Nadeau K, Wit JM, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: Lessons from STAT5b gene mutations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(1):61-75. doi:10.1016/j.beem.2010.09.003
31. Klammt J, Neumann D, Gevers EF, et al. Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-04521-0
32. Hwa V. STAT5B deficiency: Impacts on human growth and immunity. *Growth Horm IGF Res*. 2016;28:16-20. doi:10.1016/j.ghir.2015.12.006
33. Bacchetta R, Barzaghi F, Roncarolo MG. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: A lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1417(1):5-22. doi:10.1111/nyas.13011
34. Gambineri E, Ciullini Mannurita S, Hagin D, et al. Clinical, Immunological, and Molecular Heterogeneity of 173 Patients With the Phenotype of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked (IPEX) Syndrome. *Front Immunol*. 2018;9(NOV). doi:10.3389/fimmu.2018.02411
35. Hwang JL, Park SY, Ye H, et al. FOXP3 mutations causing early-onset insulin-requiring diabetes but without other features of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Pediatr Diabetes*. 2018;19(3):388-392. doi:10.1111/pedi.12612
36. Duclaux-Loras R, Charbit-Henrion F, Neven B, et al. Clinical Heterogeneity of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: A French Multicenter Retrospective Study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018;9(10). doi:10.1038/s41424-018-0064-x
37. Johnson MB, De Franco E, Allen HL, et al. Recessively inherited LRBA mutations cause autoimmunity presenting as neonatal diabetes. *Diabetes*. 2017;66(8):2316-2322. doi:10.2337/db17-0040
38. Kardelen AD, Kara M, Güller D, et al. LRBA deficiency: a rare cause of type 1 diabetes, colitis, and severe immunodeficiency. *Hormones*. 2021;20(2):389-394. doi:10.1007/s42000-020-00257-z
39. Sanyoura M, Lundgrin EL, et al. Novel compound heterozygous LRBA deletions in a 6-month-old with neonatal diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021;175:108798. doi:10.1016/j.diabres.2021.108798