

MARIA REGINA FRANCO RIBEIRO GASPARIN

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ESTUDO DO
GENE *WFS1* NA SÍNDROME DE WOLFRAM**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA REGINA FRANCO RIBEIRO GASPARIN

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ESTUDO DO
GENE *WFS1* NA SÍNDROME DE WOLFRAM**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Orientadora

Profa. Dra. Regina C. M. Santiago Moisés

Coordenador

Prof. Dr. Sérgio Atalla Dib

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Gasparin, Maria Regina Franco Ribeiro

Caracterização clínica e estudo do gene *WFS1* na Síndrome de Wolfram / Maria Regina Franco Ribeiro Gasparin -- São Paulo, 2007.

ix, 56f

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação da Disciplina de Endocrinologia. Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Título em inglês: Clinical and molecular characterization of *WFS1* gene in Wolfram Syndrome patients.

1. Síndrome de Wolfram; 2. DIDMOAD; 3. *WFS1*

“Procure imaginar como cada um de vocês se sentiria se, de repente, ficasse cego hoje. Imaginem vocês tropeçando e andando às apalpadelas tanto durante o dia como à noite; o seu trabalho, a sua independência, tudo perdido. Neste mundo escuro não seria bom se um amigo pegasse a sua mão e dissesse: Venha comigo e lhe ensinarei a como fazer as coisas que você fazia quando podia ver...

Precisamos mais do seu carinho do que do seu dinheiro. O presente, sem a simpatia e o interesse daquele que dá, é vazio. Se vocês se preocupam, se pudermos fazer com que as pessoas deste grande país também se preocupem, os cegos terão a oportunidade de combater a escuridão...

Vocês me ajudarão a chegar ao dia no qual não teremos mais cegueira evitável; no qual nenhuma criança surda ou cega ficará sem escola; no qual nenhum homem ou mulher cega ficará sem ajuda? Apelo para vocês... que podem ver, vocês que podem ouvir, vocês que são fortes, corajosos e bondosos. Vocês se tornarão os Paladinos dos Cegos na cruzada contra a escuridão? ”

Helen Adams Keller - Filósofa e escritora (cega, surda e muda)

**Discurso em 30 de junho de 1925, na Convenção do Lions Club Internacional
Realizada em Cedar Point, Ohio, EUA.**

“Que posso dizer para alguém que tenha alguma deficiência, é para nunca lembrar dela ,
ter alguma atividade, por mais simples que possa parecer.”

Ricardo Collorio (Diabético e deficiente visual)

ric@nh.conex.com.br

SUMÁRIO

Dedicatória	vi
Agradecimentos	Vii
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
ARTIGO 1:	
Síndrome de Wolfram: da definição às bases moleculares	16
OBJETIVOS	32
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	33
ARTIGO 2:	
Identification of Novel Mutations in <i>WFS1</i> Gene in Brazilian Patients with Wolfram Syndrome	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
CONCLUSÕES	56
Anexos	

Aos meus alicerces
Pai, Mãe, Irmãs, Sobrinhos e Tom,
as razões das minhas conquistas
e do meu equilíbrio

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Regina Célia Mello Santiago Moisés, pela confiança e credibilidade ao me oferecer este projeto e me apresentar à biologia molecular. Pela sua capacidade e envolvimento durante a orientação do estudo, além das agradáveis reuniões nas manhãs de sexta-feira, junto com os demais pós-graduandos, enriquecendo nossas discussões. Pela amizade e oportunidades oferecidas, mesmo não relacionadas ao nosso projeto, durante estes anos de convivência, a minha sincera gratidão.

A toda a equipe do Laboratório de Endocrinologia Molecular da UNIFESP: Felipe Crispim, pela ajuda imprescindível no estudo molecular dos pacientes; Ilda, Teresa e Gilberto, pela dedicação e paciência com minha inexperiência com o desconhecido “mundo da biologia molecular e das pipetas”; Ângela, pela ajuda na parte burocrática e pelos bolos deliciosos; Fátima, pelo cuidado com os materiais do laboratório; Gisele, Flávia, Gustavo, Valter, Rosane e Janete, por me apresentarem à tão temida clonagem e estarem sempre dispostos a ajudar; Bete, Cleber, Claudinha, Bel, Denise e Fernando pelos períodos agradáveis de descontração; pós-graduandos orientados pela Dra. Regina: Márcio, Felipe, Patrícia e Lucimary, pela troca de experiências e angústias. A todos vocês, um agradecimento em conjunto pela amizade aqui iniciada.

Aos pacientes e seus familiares, pela colaboração e por aceitar em participar do estudo.

À equipe do Centro de Diabetes da UNIFESP: Ana, Vera, Michele, Paula, enfermeiras Célia e Odete, pelo carinho especial com os pacientes e familiares do meu projeto, atendidos quase sempre em “consultas surpresas”, sem hora marcada.

Ao Dr. João Paulo Botelho Vieira Filho e Dra. Sônia Fusaro, pelas orientações no ambulatório; e Prof. Dr. Sérgio Atalla Dib, pelo brilhantismo e disposição ao esclarecer dúvidas.

Aos residentes da Endocrinologia - UNIFESP, hoje pós-graduandos: Maria Deolinda, Carolina, Monike, André, Camila, Michele e Janaína; e Dra. Mônica Gabbay, pelo auxílio no ambulatório e durante as internações ou mesmo indicando pacientes para o estudo.

Às secretárias Amarílis, Ieda e Margarete, pelo auxílio e paciência com minha inexperiência na pós-graduação.

Aos médicos Dra. Sílvia Leda F. M. Paula, Dr. Ivaldir Sabino Dalbosco, Dra. Maria Beatriz S. Freire, Dr. João Marcelo Marcantonio, Dra. Thais Della Manna, Dr. Aléxis Dourado Guedes, Dr. Fábio Gasparin, Dr. João Eduardo Nunes Salles, Dr. Márcio Gambini, que participaram em conjunto deste estudo, em seus devidos centros, contribuindo para o aumento da nossa casuística.

Às fonoaudiólogas do NIAPEA, em especial à Prof^a. Dra. Maria Cecília Martinelli, pelo atendimento e fornecimento das próteses auditivas aos pacientes.

Ao Prof. Dr. Acary Souza Bulle de Oliveira – Setor de Doenças Neuromusculares, pelo acompanhamento e pela atenção dada aos pacientes com comprometimento neurológico.

À FAPESP, pelo suporte financeiro do projeto de pesquisa e ao CNPq, pela bolsa de estudo durante estes quase quatro anos.

Aos professores da disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Marília: Dra. Heloísa Cerqueira C. Villar, Dr. José Augusto Sgarbi, Dr. Pascoal Tomazzella Jr e Dr. Hissachi Tsuchi, pela importante contribuição no meu aprendizado em Endocrinologia. Em especial ao Dr. Sgarbi, por me apresentar à Dra. Regina Moisés; e ao Dr. Hissachi, por me apresentar à medicina psicossomática com uma visão integral do doente, e não apenas da doença.

À minha família. Seria injusto citar poucos nomes e não caberiam todos nesta página: tios, tias, primos e primas, incluindo os que não estão mais neste plano, cada um contribuiu de forma importante para o meu crescimento e para o decorrer da minha vida.

À minha mais nova família, Gasparin, por me acolher com tanto carinho.

Aos meus avós, pelo sentido de família ensinado aos seus descendentes. À Vovó Lula, uma das minhas referências de mulher: forte, determinada e vencedora.

Aos meus cunhados: Luciano, Eduardo e Fábio, por trazerem um conteúdo masculino a uma casa com um conceito tão feminino e por amarem minhas irmãs.

Aos meus sobrinhos: Antônio, Eduardo, Juliana e Beatriz, por adoçarem minha vida e trazerem tanta alegria à nossa família.

Às minhas irmãs: Ana Beatriz, Ana Elisa e Maria Teresa. Minhas companheiras, minhas amigas, meus ouvidos. Também minhas referências de mulher. Cada uma de vocês influenciou minha vida e este projeto de alguma forma: as Anas, fonoaudiólogas, com várias dicas sobre deficiência auditiva e audiometria; Maria Teresa, que desde criança me ensina o que é superação e também me proporcionou o saber lidar e entender os portadores de deficiências. Embora seja deficiente auditiva, ela sabe ouvir e entender o ser humano melhor que qualquer pessoa com audição perfeita.

Aos meus pais: Mário e Zilca, por me apoiarem em todas as fases da minha vida. Pelo amor e dedicação incondicional à família. Pelo investimento financeiro e emocional na minha carreira e na minha vida. Pelo exemplo, e por me ensinarem o que é Sabedoria. Pai, pelo conceito de homem e de médico: humano, humilde, sensato, íntegro, que ama e honra a profissão. Mãe, a minha personalidade igual à sua já diz que você é a principal referência na minha vida. Espero seguir seus passos de mulher forte, determinada, amiga e humana.

Ao meu esposo Fábio (Tom), por ter me trazido a São Paulo, mesmo a contra gosto, resultando no meu Doutorado. Por me amar, ser companheiro e amigo. Enfim, por ser você quem me completa, me acalma e dá sentido à minha vida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente influenciaram o meu desenvolvimento ou que passaram pela minha vida, também deixo meu obrigada e meu pedido de desculpas por não citar os nomes. Tais agradecimentos mereceriam uma tese em separado.

INTRODUÇÃO

A Síndrome de Wolfram (SW) é uma doença rara de herança autossômica recessiva, neurodegenerativa progressiva e caracterizada pela associação de diabetes mellitus e atrofia do nervo óptico. Outros comemorativos da síndrome freqüentes, porém não obrigatórios, são diabetes insipidus e surdez neurossensorial, justificando o acrônimo DIDMOAD (*Diabetes Insipidus; Diabetes Mellitus; Optic Atrophy; Deafness*) pelo qual a síndrome é também conhecida. Uma descrição clínica mais detalhada da SW encontra-se em nosso artigo de revisão (Artigo 1).

Mortalidade

A SW é uma doença grave, debilitante e associada à mortalidade precoce. Enquanto no diabetes mellitus tipo 1 a mortalidade estimada é de 20,4% nos indivíduos após 30 anos de diagnóstico da doença⁽¹⁾; na SW 60% dos indivíduos morrem antes dos 35 anos de idade⁽²⁾. Através da análise de prontuários de portadores de SW residentes nos Estados Unidos, Kinsley e col., verificaram que a idade média de óbito nesses indivíduos foi 28 anos (14,75 a 43,5 anos); de forma similar, na série reportada por Barret e col., entre pacientes do Reino Unido, a idade média de óbito foi 30 anos (25 a 49 anos)^(2,3).

Dentre as causas de óbito estão: reação hipoglicêmica severa; doença renal progressiva secundária à atonia do trato urinário e infecção; disfunção progressiva do sistema nervoso central; falência cardio-respiratória e suicídio.

Genes *WFS1* e *ZCD2*

Em 1998 dois grupos independentes, utilizando abordagens diferentes, identificaram o gene responsável pela SW, sendo atualmente referido como *WFS1*^(4,5). Esse gene localizado no cromossomo 4p16 é constituído por 8 exons, estendendo-se por 33.4 Kb do DNA genômico. A tradução se inicia no segundo exon e codifica um peptídeo de 890 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 100 kDa denominado wolframina^(4,5) (Figura1). A região promotora do gene *WFS1* localiza-se 233 pb anteriores à base inicial do exon 1 e estende-se até o nucleotídeo 104 do exon 1 (-233 a +104 pb). Há uma região promotora mínima necessária para atividade do gene (-40 a +104pb), que é regulada por fatores de transcrição da família Sp (Sp1 e SP3)⁽⁶⁾.

Enquanto a maioria dos portadores de SW apresenta mutações no gene *WFS1*, heterogeneidade genética foi demonstrada através da identificação de um locus adicional na região 4q22-24 em famílias jordanianas consangüíneas, que foi denominado locus *WFS2*⁽⁷⁾. Os portadores da síndrome nessas famílias não apresentaram diabetes insipidus e sintomas adicionais não observados anteriormente, tais como tendência a sangramentos e defeitos na agregação plaquetária, foram notados em muitos desses indivíduos⁽⁸⁾. Ainda, úlcera péptica com tendência a sangramentos levando a hemorragia gastro-intestinal também foi observada. Em Outubro de 2007 o mesmo grupo que havia identificado o segundo locus de suscetibilidade para a SW reportou a identificação do gene responsável por essa associação. Amr e col. identificaram uma mutação missense em um novo e altamente conservado gene “zinc finger” (*ZCD2*) em todos os indivíduos afetados dessas três famílias⁽⁹⁾. De forma semelhante ao gene

WFS1, o gene *ZCD2* codifica uma proteína, ERIS (*Endoplasmatic Reticulum Intermembrane Small Protein*), de localização no retículo endoplasmático.

Mutações no gene *WFS1*

Desde a identificação do gene *WFS1*, mutações em homozigose ou heterozigose composta têm sido identificadas na maioria dos portadores da SW. Sendo uma doença rara de herança autossômica recessiva, uma alta proporção de indivíduos afetados são carreadores de mutações em homozigose, resultante de consangüinidade. Dentre as mutações descritas estão incluídas inserções, deleções, *missense* e *nonsense*. Em alguns grupos populacionais algumas mutações são mais freqüentes, como por exemplo, entre os espanhóis a mutação c.424_425 ins16 é particularmente freqüente⁽¹⁰⁾, enquanto outras mutações não são recorrentes. Além de mutações no exon 8, o mais longo, também já foram identificadas mutações nos exons 4⁽¹⁰⁻¹⁶⁾, 5^(5,13,17,18), 6^(5,15,16) e 7⁽¹³⁾. Análise da mutação em relação à posição do aminoácido afetado não mostra nenhum *hot spot* significativa.

Hofmann e col., estudando fibroblastos de pacientes com SW, verificaram que nas mutações *nonsense* e *frameshift* havia completa ausência da wolframina devido à rápida degradação do transcrito, em vez de síntese de proteína truncada⁽¹⁹⁾. Portanto, o estudo sugere que a degradação do transcrito *nonsense* do gene *WFS1* previne a tradução de produtos truncados, e esse seria o mecanismo molecular da perda da função da wolframina nos pacientes com SW.

Variantes no gene WFS1: além da Síndrome de Wolfram

Além da síndrome de Wolfram, mutações em heterozigose no gene *WFS1* foram mais recentemente reconhecidas como causa de Deficiência Auditiva Neurosensorial de Baixa Freqüência Não Sindrômica (MIM # 600965; em inglês referida pela sigla LFSNHI, de *low frequency sensorineural hearing impairment*). LFSNHI é um tipo incomum de déficit auditivo onde freqüências de 2000 Hz e abaixo são predominantemente afetadas. Como a audição para alta freqüência é preservada, os pacientes afetados mantêm bom entendimento da fala⁽²⁰⁾. Já, os portadores da síndrome de Wolfram caracteristicamente apresentam perda auditiva neurosensorial em freqüências altas com posterior progressão para freqüências baixas. Cryns e col., estudando pacientes com deficiência auditiva, demonstraram que mutações no gene *WFS1* são uma causa freqüente de LFSNHI de herança autossômica dominante, mas não contribuem para os casos isolados⁽²¹⁾. Interessantemente, as mutações descritas são não inativadoras e localizam-se no domínio carboxi-terminal da proteína.

Ainda, variantes no gene *WFS1* têm sido avaliadas quanto a seu papel para o desenvolvimento das formas comuns de diabetes mellitus. Awata e col., avaliaram pacientes japoneses portadores de DM tipo 1 e indivíduos controle e encontraram associação significativa entre as variantes I720V, H611R e R456H com o DM tipo 1, sendo esta última de alta significância⁽²²⁾. Já, Kawamoto e col. estudando portadores de DM tipo 2 verificaram maior freqüência das variantes H456 e R611 nos diabéticos do que nos controles⁽²³⁾. Minton e col., em pacientes do Reino Unido, verificaram uma associação entre DM tipo 2 e as variantes alélicas R456 e H611⁽²⁴⁾. Recentemente, Sandhu e col. identificaram associações

bastante significativas entre SNPs no gene *WFS1* e risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 em população do Reino Unido; resultados esses que foram replicados entre a população Ashkenazi⁽²⁵⁾. Portanto, parece que mutações no gene *WFS1* causam a SW, enquanto variantes mais freqüentes são fatores de predisposição para as formas comuns de Diabetes Mellitus.

A avaliação de pais de pacientes com SW (carreadores obrigatórios) mostrou que portadores de mutações heterozigóticas são 26 vezes mais predispostos à hospitalização por doença psiquiátrica do que aqueles sem mutação⁽²⁶⁾. A depressão, incluindo tentativa de suicídio, foi a principal manifestação psiquiátrica encontrada. Um questionário realizado com familiares e portadores da SW revelou vários distúrbios comportamentais, além de depressão, tais como dificuldades na escola, abuso de droga ou álcool, dificuldades matrimoniais, etc.⁽²⁷⁾. Entretanto, Ohtsuki e col. não encontraram diferenças na freqüência de variantes no gene *WFS1* entre pacientes com distúrbio bipolar ou depressão quando comparados com indivíduos controle⁽²⁸⁾. De forma similar, Kawamoto e col. também não verificaram diferença significativa entre controles e pacientes com distúrbio bipolar em relação a variantes genéticas no gene *WFS1*, embora a pequena amostra de pacientes tenha limitado o estudo⁽²³⁾.

Assim, alguns estudos sugerem que carreadores de variantes no gene *WFS1* apresentam maior risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus, distúrbios psiquiátricos e surdez não sindrômica. Porém, grandes estudos populacionais de associação e análise funcional dessas variantes no gene *WFS1* são necessários para investigar essas associações genéticas.

Wolframina: estrutura e função

A wolframina é expressa em altos níveis no cérebro, pâncreas, coração, placenta, pulmões, músculos e células de insulinomas; tem expressão moderada no fígado e baixa expressão nos rins e baço^(4,5,19). No pâncreas apresenta uma expressão alta nas células β e uma expressão muito baixa nas células α , δ ⁽²⁹⁾. Essa proteína não apresenta homologia com qualquer outra família de proteína, sendo, portanto referida como membro de uma nova família de proteínas⁽¹⁹⁾.

A wolframina é uma glicoproteína de localização na membrana do retículo endoplasmático (RE)^(30,31). Na sua estrutura identificam-se três domínios: um domínio central contendo nove segmentos transmembrana hidrofóbicos, um domínio hidrofílico carboxi-terminal voltado para o lúmen do RE e um domínio hidrofílico amino-terminal voltado para o citoplasma da célula⁽¹⁹⁾, (Figura1). Esta proteína sofre N-glicosilação pós-tradução, o que é importante para sua síntese e sua estabilidade^(19,30,32), e parece ser a única forma de modificação pós-tradução da wolframina, uma vez que não sofre processamento proteolítico e nem fosforilação. Os sítios de glicosilação são os resíduos asparagina (N) nas posições 661 e 746, ambos localizados na porção carboxi-terminal da wolframina, no lúmen do RE. Além disso, foi reportado que a wolframina forma complexos de peso molecular maiores (~400 kDa), sugerindo a formação de homo-oligômeros, pelo fato desse peso molecular ser 4 vezes o do monômero da wolframina⁽¹⁹⁾.

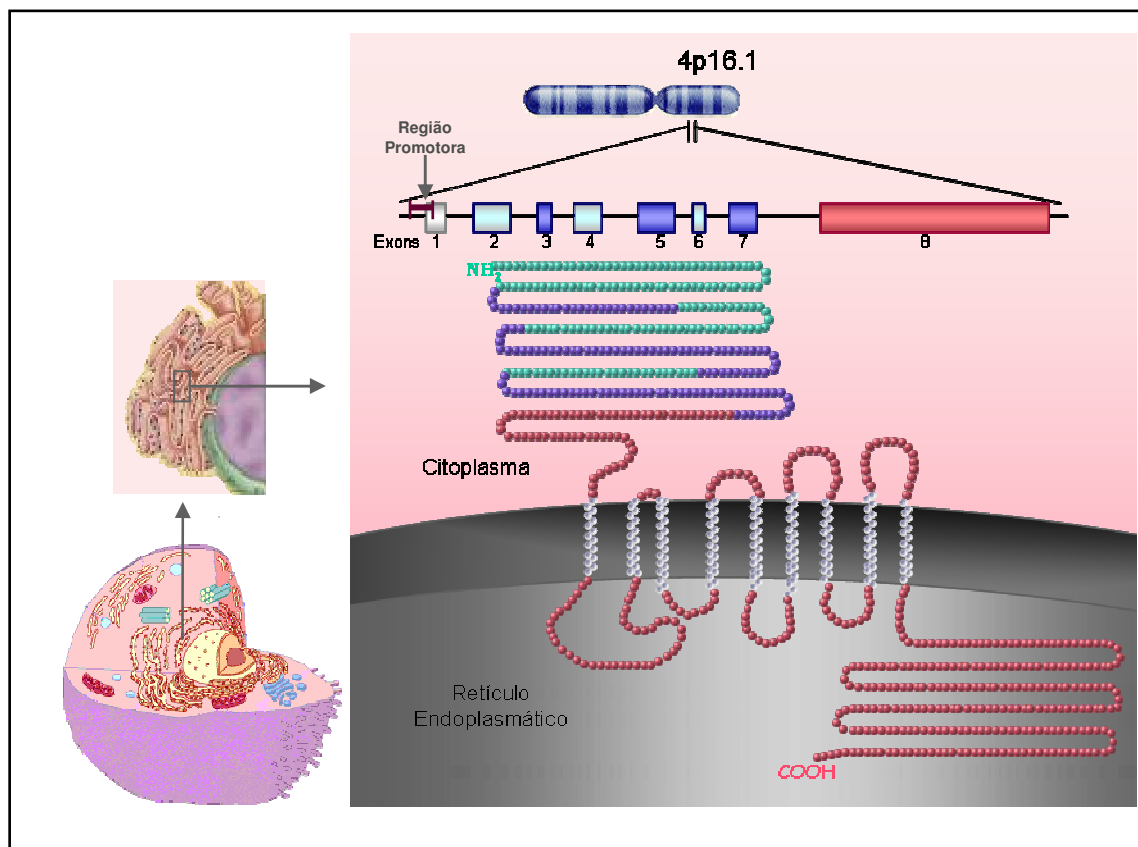


Figura1: Representação do gene *WFS1* e da proteína wolframina

Atrofia e morte das células são as características morfológicas mais comuns na SW. McBain e col., utilizando um transcrito *antisense* para modular a expressão da wolframina em linhagem de células β (BRIN-BD11), observaram que a expressão da wolframina é crítica para o crescimento e a proliferação das células β ⁽³³⁾. Já, Riggs e col., utilizando camundongos com nocaute do gene *WFS1* em células β pancreáticas (β *Wfs*^{-/-}), verificaram que em relação aos controles, os camundongos *Wfs*^{-/-} não apresentavam diferenças ao nascimento, porém após 12 semanas desenvolveram hiperglicemia e insulinopenia, com assimetria das ilhotas e diminuição da massa de células β . Também se observou um aumento da caspase 3, um marcador de apoptose, e elevação da expressão

de genes que codificam BiP e CHOP (*C/EBP-homologous protein*), marcadores de estresse do RE⁽³⁴⁾.

A localização da wolframina no RE sugere um papel na regulação da homeostase do cálcio no RE, no transporte de membrana ou no processamento protéico⁽³⁰⁾. Osman e col. avaliaram oócitos de *Xenopus* com expressão normal do gene *WFS1* e verificaram um aumento do Ca^{++} citosólico e indução da atividade de canal cátion-seletivo na membrana do RE. Interessantemente, esses efeitos não ocorreram em oócitos com *WFS1* mutante⁽³¹⁾. Esses dados sugerem que a wolframina pode agir como reguladora da atividade do canal de Ca^{++} do RE ou pode ser um novo canal de Ca^{++} no RE, visto que muitos canais de cálcio voltagem dependentes são tetraméricos. Uma vez que a regulação do Ca^{++} pelo RE é importante na apoptose celular, é possível que a wolframina esteja envolvida na regulação das decisões de morte celular originadas no RE. Portanto, um defeito nesse processo seria responsável pela perda progressiva das células β e pela degeneração neuronal, características da síndrome de Wolfram⁽³¹⁾.

A célula β pancreática possui um RE extremamente desenvolvido. Dentre as funções principais do RE incluem-se a modificação pós-tradução, o processamento da proteína para formação da sua estrutura tridimensional (*fold*ing), e o “empacotamento” (*assembly*) das proteínas recém sintetizadas. Condições em que há um desequilíbrio entre a demanda exigida do RE e a capacidade do processamento das proteínas são conhecidas como “estresse do RE”. Para se defender do estresse do RE, há uma resposta adaptativa denominada UPR (*unfolded protein response*)⁽³⁵⁾. As proteínas de membrana do RE estão frequentemente envolvidas na UPR. Evidências sugerem que altos

níveis de estresse do RE ou UPR defeituosa são causa de morte de células β durante o desenvolvimento do diabetes^(36,37). Dados de Fonseca e col. demonstram que a wolframina é um componente da UPR tendo papel importante na manutenção da homeostase do ER, especialmente nas células β pancreáticas⁽³⁵⁾. Esses achados sugerem que a wolframina protege as células β pancreáticas contra o estresse do RE e que estresse do ER crônico é causado por perda de função da wolframina. Portanto a patogênese da SW pode ser atribuída a altos níveis estresse do ER crônico decorrente da falta de wolframina funcionando nas células β pancreáticas. Interessante é a alta expressão da proteína em pulmão e placenta, tecidos não afetados na SW. É possível que outros genes, expressos especificamente nesses tecidos, compensem a falta da wolframina. Estudos recentes demonstram que a expressão do *WFS1* pode ser aumentada em certos tecidos como, por exemplo, no pâncreas pelo estresse do RE, mas não em outros como coração e músculo esquelético⁽³⁸⁾. É possível que alguns tecidos aumentem a produção de outras proteínas para combater o estresse do RE, enquanto que os tecidos afetados respondam aumentando apenas a expressão do *WFS1*. Isso explicaria porque apenas alguns tecidos são afetados na SW, uma vez que *WFS1* é expresso em diferentes tecidos, porém com níveis diferentes de expressão.

Adicionalmente, um papel da wolframina na morte celular programada, independente do estresse do RE foi sugerido por Philbrook e col., apesar de não ser claro qual o mecanismo envolvido⁽³⁹⁾. Ainda, em um recente estudo, Zatyka e col. demonstraram que a Wolframina interage com a subunidade $\beta 1$ da bomba Na^+/K^+ ATPase através de 2 domínios: um localizado na porção C-

terminal da wolframina (aminoácidos 652 a 890) e o outro na região transmembrana (aminoácidos 322 a 652). Células com expressão reduzida da wolframina apresentaram diminuição na expressão da bomba Na^+/K^+ ATPase. Os resultados sugerem que uma insuficiência da Na^+/K^+ ATPase poderia contribuir para os mecanismos de apoptose e possivelmente com a alteração na secreção de insulina reportados nos pacientes com síndrome de Wolfram⁽⁴⁰⁾.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nishimura R, LaPorte RE, Dorman JS, Tajima N, Becker D, Orchard TJ. Mortality trends in type 1 diabetes. The Allegheny County (Pennsylvania) Registry 1965-1999. *Diabetes Care* 2001;24:823-827.
2. Kinsley BT, Swift M, Dumont RH, Swift RG. Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care* 1995;18:1566-1570.
3. Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 1995;346:1458-1463.
4. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, et al. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genetics* 1998;20:143-148.
5. Strom TM, Hortnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, et al. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Molec Genet* 1998;7:2021-2028.
6. Ricketts C, Zatyka M, Barrett T. The characterisation of the human Wolfram syndrome gene promoter demonstrating regulation by Sp1 and Sp3 transcription factors. *Biochim Biophys Acta* 2006;1759:367-377.
7. El-Shanti H, Lidral AC, Jarrah N, Druhan L, Ajlouni K. Homozygosity mapping identities and additional locus for Wolfram syndrome on chromosome 4q. *Am J Hum Genet* 2000;66:1229-1236.
8. Al-Sheyyab M, Jarrah N, Younis E, Shennak MM, Hadidi A, Awidi A, El-Shanti H, Ajlouni K. Bleeding tendency in Wolfram syndrome: a newly identified feature with phenotype genotype correlation. *Eur J Pediatr* 2001;160:243-246.
9. Amr S, Heisey C, Zhang M, Xia XJ, Shows KH, Ajlouni K, Pandya A, Satin LS, El-Shanti H, Shiang R. A homozygous mutation in a novel zinc-finger protein, ERIS, is responsible for Wolfram syndrome 2. *Am J Hum Genet* 2007;81:673-683.

10. Gomez-Zaera M, Strom TM, Rodriguez B, Estivill X, Meitinger T, Nunes V. Presence of a major WFS1 mutation in Spanish Wolfram syndrome pedigrees. *Mol Genet Metab* 2001; 72:72-81.
11. Domènech E, Gómez-Zaera M, Nunes V. Study of the WFS1 gene and mitochondrial DNA in Spanish Wolfram syndrome families. *Clin Genet* 2004;65:463-469
12. Giuliano F, Bannwarth S, Monnot S, Cano A, Chabrol B, Vialettes B, Delobel B, Paquis-Flucklinger, French Group of WS V. 2005. Wolfram syndrome in French population: characterization of novel mutations and polymorphisms in the WFS1 gene. *Hum Mutat* 25:99-100.
13. Hardy C, Khanin F, Torres R, Scott-Brown M, Seller A, Poulton J, et al. Clinical and molecular genetic analyses of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am J Hum Genet* 1999;65:1279-1290.
14. Smith CJA, Crock PA, King BR, Meldrum CJ, Scott RJ. Phenotype-Genotype Correlations in a Series of Wolfram Syndromes Families. *Diabetes Care* 2004;27:2003-2009.
15. Cano A, Rouzier C, Monnot S, Chabrol B, Conrath J, Lecomte P, Delobel B, Boileau P, Valero R, Procaccio V, Paquis-Flucklinger V, French Group of Wolfram Syndrome, Vialettes B. Identification of novel mutations in WFS1 and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Am J Med Genet A* 2007;143:1605-1612.
16. Khanim F, Kirk J, Latif F, Barrett TG. WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Hum Mutat* 2001;17:357-367.
17. Colosimo A, Guida V, Rigoli L, Di-Bella C, De-Luca A, Briuglia S, et al. Molecular detection of novel WFS1 mutations in patients with Wolfram syndrome by a DHPLC-based assay. *Hum Mutat* 2003;21:622-629.
18. Van Den Ouweland JMW, Cryns K, Pennings RJE, Walraven I, Janssen GMC, Maassen JA, Veldhuijzen BFE, Arntzenius AB, Lindhout D, Cremers CWRJ, Van Camp G, Dikkeschei LD. Molecular characterization of WFS1 in patients with Wolfram syndrome. *J Mol Diagn* 2003;5:88-95.

19. Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD, Bauer MF. 2003. Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet* 12:2003-2012.
20. Bernalova IN, Van Camp G, Bom SJH, Brown DJ, Cryns K, DeWan AT, Erson A E, Flothmann K, Kunst HPM, Kurnool P, Sivakumaran TA, Cremers CWRJ, Leal SM, Burmeister M, Lesperance MM. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum. Molec. Genet* 2001;10:2501-2508.
21. Cryns K, Pfister M, Pennings RJE, Bom SJH, Flothmann K, Caethoven G, Kremer H, Schatteman I, Köln KA, Tóth T, Kupka S, Blin N, Nürnberg P, Thiele H, van de Heyning PH, Reardon W, Stephens D, Cremers CWRJ, Smith RJH, Van Camp G. Mutations in the WFS1 gene that cause low-frequency sensorineural hearing loss are small non-inactivating mutations. *Hum Genet* 2002;110:389-394.
22. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Inoue I, Abe T, Takino H, Kanazawa Y, Katayama S. Missense variations of the gene responsible for Wolfram syndrome (WFS1/wolframin) in Japanese: possible contribution of the Arg456His mutation to type 1 diabetes as a nonautoimmune genetic basis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:612-616.
23. Kawamoto T, Horikawa Y, Tanaka T, Kabe N, Takeda J, Mikuni M. Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder. *Mol Genet Metab* 2004;82:238-245
24. Minton JAL, Hattersley AT, Owen K, McCarthy MI, Walker M, Latif F, Barrett T, Frayling TM. Association studies of genetic variation in the WFS1 gene and type 2 diabetes in U.K. populations. *Diabetes* 2002;51:1287-1290.
25. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL, Daly A, Lango H, Frayling TM, Neumann RJ, Sherva R, Blech I, Pharoah PD, Palmer CN, Kimber C, Tavendale R, Morris AD, McCarthy MI, Walker M, Hitman G, Glaser B, Permutt MA, Hattersley AT, Wareham NJ, Barroso I. Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007;39:951-953.
26. Swift RG, Polymeropoulos MH, Torres R, Swift M. Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 1998;3:86-91.

27. Swift M, Swift RG. Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus. *Biol Psychiatry* 2000;47:787-793.
28. Ohtsuki T, Ishiguro H, Yoshikawa T, Arinami T. WFS1 gene mutation search in depressive patients: detection of five missense polymorphisms but no association with depression or bipolar affective disorder. *J Affect Disord* 2000;58:11-17.
29. Hishirara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 2004;13:1159-1170.
30. Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K, Oka Y. WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 2001;10:477-484.
31. Osman A, Saito M, Makepeace C, Permutt A, Schesinger P, Mueckler M. Wolframin Expression Induces Novel Ion Channel Activity in Endoplasmic Reticulum Membranes and Increases Intracellular Calcium. *J Biol Chem* 2003;278:53755-52762.
32. Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, Oka Y. Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:250-256.
33. McBain SC, Morgan NG. Functional effects of expression of wolframin-antisense transcripts in BRIN-BD11-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:684-688.
34. Riggs AC, Bernal-Mizrachi E, Ohsugi M, Wasson J, Fatrai S, Welling C, Murray J, Schmidt RE, Herrera PL, Permutt MA. Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 2005;48:2313-2321.
35. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F. WFS1 Is a Novel Component of the Unfolded Protein Response and Maintains Homeostasis of the Endoplasmic Reticulum in Pancreatic β Cells. *J Biol Che* 2005;280:39609–39615.

36. Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 2002;51 (Suppl 3):455-461.
37. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;110:1389-1398.
38. Kakiuchi C, Ishiwata M, Hayashi A, Kato T. XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2006;97:545-555.
39. Philbrook C, Fritz E, Weiher H. Expressional and functional studies of wolframin, the gene function deficient in Wolfram syndrome, in mice and patients cells. *Exp Gerontol* 2005;40:671-678.
40. Zatyka M, Ricketts C, da Silva Xavier G, Minton J, Fenton S, Hofmann-Thiel S, Rutter GA, Barrett T. Sodium-potassium ATPase beta 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum (ER) protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet* 2007 Oct 18; [Epub ahead of print].

Síndrome de Wolfram: da Definição às Bases Moleculares

Maria Regina F. Ribeiro

Felipe Crispim

Márcio F.Vendramini

Regina S. Moisés

Disciplina de Endocrinologia, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), São Paulo, SP.

Endereço para correspondência:

Regina S. Moisés, MD, PhD

Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Disciplina de Endocrinologia

Rua Botucatu, 740 – 2º andar

04034-970 São Paulo, SP, Brazil

Phone: +55 11 5576-4229, Fax: +55 11 5579-6636

E-mail: rmoises@endocrino.epm.br

Título resumido: Síndrome de Wolfram

Publicado em: **Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50:839-844.**

RESUMO

A Síndrome de Wolfram (SW) é uma condição neurodegenerativa, progressiva de herança autossômica recessiva caracterizada pela presença de diabetes mellitus e atrofia óptica. Frequentemente também estão presentes o diabetes insipidus e disacusia neurossensorial, explicando o acrônimo DIDMOAD (*diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness*) pelo qual a síndrome é também conhecida. Além desses, outros commemorativos tais como bexiga neurogênica, ataxia, nistagmo e predisposição a doenças psiquiátricas podem também estar presentes. Em 1994 identificou-se no cromossomo 4p16.1 um dos genes responsável pela SW, que foi denominado *WFS1* ou wolframina. Esse gene codifica uma proteína de 890 aminoácidos de localização no retículo endoplasmático. A função da proteína wolframina ainda não está completamente definida, porém sua localização no retículo endoplasmático sugere um papel na regulação da homeostase do cálcio, transporte de membrana ou processamento protéico. O entendimento de como alterações na wolframina resultam em diabetes e neurodegeneração é essencial para o desenvolvimento de terapias para prevenir ou atenuar as conseqüências da SW.

Descritores: Síndrome de Wolfram, DIDMOAD, *WFS1*, wolframina, Diabetes Mellitus

ABSTRACT

Wolfram Syndrome: from Definition to Molecular Bases

Wolfram Syndrome (WS) is an autosomal recessive progressive neurodegenerative disorder characterized by diabetes mellitus and optic atrophy. Diabetes insipidus and sensorineural deafness are also noted frequently, explaining the acronym DIDMOAD (diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness) by which the syndrome is also referred. Additional manifestations such as atonic bladder, ataxia, nystagmus and predisposition for psychiatric illness may be present. The Wolfram syndrome gene, *WFS1*, was mapped to chromosome 4p16.1 by positional cloning. It encodes a 890 amino acid polypeptide named wolframin. Although the wolframin function is still not completely known, its localization to the endoplasmic reticulum suggests it can play a role in calcium homeostasis, membrane trafficking and protein processing. To know the cellular function of wolframin is necessary for understanding the pathophysiology of Wolfram syndrome. This knowledge may lead to development of therapies to prevent or reduce the outcomes of WS.

Keywords: Wolfram syndrome, DIDMOAD, *WFS1*, wolframin, Diabetes Mellitus

A Síndrome de Wolfram (SW) é definida como uma condição neurodegenerativa envolvendo o sistema nervoso central, nervos periféricos e tecidos neuroendócrinos⁽¹⁾. É uma doença rara, progressiva e de herança autossômica recessiva que foi primeiramente descrita em 1938 por Wolfram e Wagner⁽²⁾. As características iniciais e essenciais para o diagnóstico são a presença de Diabetes Mellitus de início precoce e atrofia óptica. Esses critérios dão um valor preditivo positivo de 83% e valor preditivo negativo de 1% para a SW⁽³⁾. Em geral, o Diabetes Mellitus desenvolve-se na primeira década de vida e a atrofia óptica na segunda década⁽³⁾. Outros achados freqüentes, porém não obrigatórios, são o diabetes insipidus e a surdez explicando o acrônimo DIDMOAD (de *diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy e deafness*) pelo qual a síndrome é também conhecida. Diabetes insipidus ou surdez estão presentes em cerca de 51% dos casos, enquanto os quatro componentes cardinais estão presentes em apenas 13% dos casos⁽³⁾. Bexiga neurogênica, ataxia, nistagmo e predisposição a doenças psiquiátricas podem também ser componentes da síndrome, embora com menor freqüência. Apresentamos na Figura 1 a história natural da doença.

Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus é a primeira manifestação da SW na maioria dos casos reportados⁽⁴⁾. A idade de aparecimento é precoce, em geral na primeira década de vida, mas pode ter início na idade adulta⁽⁵⁾. É o resultado de uma deficiência de insulina de etiologia não auto-imune⁽³⁾. Estudos *postmortem* mostram uma perda seletiva das células β pancreáticas com preservação das células produtoras de glucagon e somatostatina^(4,6). Entretanto, cetoacidose não é freqüente na apresentação inicial do diabetes ou durante a evolução^(4,7). Em relação aos antígenos do sistema HLA, alguns autores sugerem uma associação positiva com HLA-DR2, que é negativamente associado ao diabetes mellitus tipo 1 clássico^(8,9). Por outro lado, os pacientes com SW apresentam uma baixa prevalência dos antígenos DR3 e DR4, haplótipos freqüentes no DM tipo 1. Em geral, os pacientes são tratados com insulina, não havendo relatos de tratamento bem sucedido a longo prazo com agentes orais. Em relação às complicações

crônicas do diabetes mellitus, uma baixa prevalência é reportada, especialmente de retinopatia e nefropatia mesmo com controle metabólico inadequado^(3,4). Entretanto, em um caso por nós reportado previamente verificamos a presença de retinopatia incipiente após 7 anos de diagnóstico da doença e controle metabólico inadequado⁽¹⁰⁾.

Atrofia óptica

A atrofia do nervo óptico é bilateral e progressiva, porém com velocidade variável de progressão. O início da diminuição da acuidade visual ocorre em geral na segunda década de vida, com idade média de 14 anos⁽¹¹⁾. O exame oftalmológico mostra palidez do nervo óptico com aumento do reflexo das artérias retinianas e angiofluoresceínografia e eletrorretinografia de campo geralmente normais. Os registros de potenciais visuais evocados revelam comprometimento na via máculo-occipital⁽¹²⁾. Estudo anátomo patológico demonstra destruição axonal e desmielinização em todo o sistema óptico^(11,13). Outras alterações oculares menos freqüentes são catarata, distúrbios da visão de cor, anormalidades pupilares, miopia, alterações do epitélio pigmentar da retina, nistagmo, perda de campo visual e glaucoma^(7,9,12,14,15).

Diabetes Insipidus

O diabetes insipidus na SW é de origem central, podendo ser parcial ou total. Barret e col. verificaram uma prevalência de DI de 73% com uma idade média ao diagnóstico de 14 anos⁽³⁾. Muitas vezes o diagnóstico é retardado pela semelhança da sintomatologia com o diabetes mellitus, sendo a poliúria e polidipsia atribuídas a um controle inadequado do diabetes mellitus em vez de manifestações do diabetes insipidus. Estudos histopatológicos mostram que o diabetes insipidus ocorre devido à atrofia e gliose do sistema neurohipofisário^(14,16,17).

Surdez

A perda auditiva é de origem neurossensorial bilateral envolvendo inicialmente sons de alta frequência com perda progressiva até as baixas frequências. A prevalência de perda auditiva ou audiograma anormal têm sido reportada entre 39 a 100%^(3,15,18), sendo, porém clinicamente evidente em apenas 12% dos casos. A perda auditiva inicia-se nas três primeiras décadas de vida, é progressiva, mas poucos pacientes tornam-se completamente surdos⁽¹⁹⁾. Muitos pacientes se beneficiam de próteses auditivas.

Anormalidades do trato urinário

As anormalidades urológicas presentes na SW são diversas e incluem graus variáveis de dilatação do trato urinário superior e disfunção vesical. A disfunção vesical mais comumente observada é uma bexiga atônica com grande capacidade^(3,7,8,15,20-22). Tekgul e col.⁽²¹⁾ reportaram que bexiga com baixa capacidade e dissinergia de esfíncter é também uma manifestação comum. Alguns autores atribuem a dilatação das vias urinárias ao fluxo aumentado devido ao diabetes insipidus e melhora dessa condição com o uso de hormônio antidiurético⁽²³⁾. Entretanto, há várias descrições de SW com dilatação das vias urinárias sem a presença de diabetes insipidus, indicando ser essa condição resultante primariamente de uma degeneração neural^(10,11,19). Chu e col.⁽²⁴⁾, através de estudo imunohistológico de parede vesical e ureter, identificaram uma diminuição importante de fibras nervosas. Uma vez que não há grandes séries de pacientes com avaliação urológica detalhada é provável que a prevalência de anormalidades urológicas na SW seja subestimada. Tekgul e col. submeteram os pacientes a uma avaliação urológica completa e reportaram que 78,5% apresentavam vários graus de hidronefrose e 93%, alguma forma de disfunção vesical⁽²¹⁾.

Complicações do SNC

Uma variedade de sintomas neurológicos tem sido descritos na SW e incluem ataxia de tronco gerando marcha instável e quedas, crises de apnéia de

origem central, perda de olfato e paladar, mioclonias, nistagmo e hemiparesia devido a infartos cerebrais. Os achados no exame de ressonância magnética do cérebro são ausência de sinal de alta intensidade da neurohipófise, atrofia da região hipotalâmica, cerebelo, tronco e córtex cerebral, além de atrofia do nervo e quiasma óptico^(17,25-27). Dados de autópsia mostram uma perda de neurônios com distrofia e edema axonal, freqüentemente associados com gliose e áreas de desmielinização sem sinais de inflamação^(28,29).

Outras manifestações

Recentemente disfunção de hipófise anterior foi reportada na SW. Medlej e col. verificaram secreção anormal de um ou mais hormônios hipofisários em 75% dos pacientes, sendo a deficiência de GH a alteração mais freqüentemente documentada⁽³⁰⁾. Interessante é que o hipopituitarismo nesses pacientes não provocou sintomas clínicos, explicando a ausência de investigação de alterações da hipófise anterior em muitos estudos prévios.

Hipogonadismo tem sido reportado em pacientes com SW do sexo masculino, tanto devido à disfunção hipotálamo hipofisária^(15,18) quanto de causa primariamente gonadal^(3,15). Muitas pacientes do sexo feminino têm menarca atrasada e irregularidades menstruais, porém não há relatos de falência ovariana. Gestações bem sucedidas têm sido reportadas^(3,4,31).

Alta prevalência de doenças psiquiátricas tem sido verificada por alguns autores. Em uma revisão de prontuários médicos de 68 pacientes portadores de SW dos Estados Unidos verificou-se que 60% apresentavam depressão grave, psicose e outras condições⁽³²⁾. Em alguns casos, as manifestações eram tão importantes que necessitavam de internação em hospital psiquiátrico. Observou-se, ainda, que indivíduos carreadores em heterozigose de mutações no gene da SW são também predispostos a doenças psiquiátricas⁽³³⁾.

Prevalência

A prevalência estimada da SW é de 1 em 100.000 a 770.000 indivíduos e a prevalência de carreadores de 1 em 100 a 354 indivíduos^(3,34,35).

Bases Moleculares

A diversidade de sintomas clínicos presentes na SW, principalmente surdez e diabetes mellitus, levou à sugestão por alguns autores de tratar-se de um defeito no suprimento de ATP que é freqüentemente observado nas mitocondriopatias⁽³⁶⁻³⁹⁾. Deleções em DNA mitocondrial foram observadas em alguns casos com características similares à SW^(40,41). Porém, em 1994 o gene para a SW foi ligado ao braço curto do cromossomo 4⁽⁴²⁾ e, posteriormente, em 1998, Inoue e col.⁽⁴³⁾ e Strom e col.⁽⁴⁴⁾, independentemente, identificaram o gene responsável no cromossomo 4p16.1, denominando-o de *WFS-1* ou wolframina, respectivamente. Em 2000, El-Shanti e col. mapearam um segundo locus envolvido na SW no cromossomo 4q22-q24 (locus *WFS-2*) em famílias consanguíneas jordanianas⁽⁴⁵⁾. Os indivíduos afetados dessas famílias não apresentavam diabetes insipidus e em muitos havia história de hemorragia gastrointestinal e úlceras pépticas.

O gene *WFS-1* ou wolframina consiste de 8 exons e estende-se por 33,4 kbases do DNA genômico. O início da tradução ocorre no segundo exon e origina um peptídeo de 890 aminoácidos com um peso molecular de 100 kDa, denominado proteína wolframina^(31,43,44). Essa proteína apresenta três domínios estruturais: uma região hidrofílica amino-terminal de aproximadamente 300 resíduos; uma região hidrofílica carboxi-terminal de aproximadamente 240 resíduos; e uma região central hidrofóbica de aproximadamente 350 resíduos que contém 9 a 10 segmentos transmembrana (Figura 2)⁽⁴³⁾. O perfil de expressão da proteína foi feito utilizando-se anticorpos contra as porções amino e carboxi terminal e verificou-se que a wolframina é abundantemente expressa no pâncreas, no cérebro, no coração e no músculo; menores quantidades são presentes no fígado e baixos níveis nos rins e no baço⁽⁴⁶⁾. No pâncreas é primariamente localizada nas células β , presente em baixos níveis nas células α e ausente no tecido exócrino⁽⁴⁷⁾. Estudos bioquímicos mostram que a wolframina é uma glicoproteína de membrana, sensível à endoglicosidase H e de localização no retículo endoplasmático, apesar de não ser claro se esse representa seu único sítio de localização⁽⁴⁸⁾.

A função da wolframina ainda não está completamente definida, porém sua localização sugere um papel na regulação da homeostase do cálcio no retículo endoplasmático, transporte de membrana ou processamento protéico⁽⁴⁸⁾. De fato, Osman e col. demonstraram que a superexpressão da wolframina em oócitos de *Xenopus* levou a um aumento do Ca^{++} citosólico e indução de atividade de canal cátion-seletivo na membrana do retículo endoplasmático⁽⁴⁷⁾. Uma vez que a regulação do Ca^{++} pelo retículo endoplasmático é importante na apoptose celular, esses dados sugerem que a wolframina possa estar envolvida na regulação da apoptose mediada pelo retículo endoplasmático e que um defeito nesse processo possa ser a causa da perda progressiva das células β pancreáticas e a degeneração neuronal associadas com a SW. Recentemente, Ishihara e col. demonstraram que camundongos com disrupção do gene *WFS-1* apresentam perda progressiva das células β e aumento de apoptose⁽⁴⁹⁾. Por outro lado, McBain e col., através do uso de transcrito anti-sense verificaram que a expressão da wolframina é crítica para o crescimento e proliferação das células β e sua expressão reduzida resulta em diminuição importante na taxa de crescimento, mas não em aumento de apoptose⁽⁵⁰⁾.

Entretanto, apesar da função exata da wolframina não estar ainda totalmente definida, é certo que mutações em seu gene são causa da SW. Várias mutações em homozigose ou heterozigose composta incluindo *missense*, *nonsense*, inserções e deleções foram identificadas na SW. Essas mutações podem ser identificadas em cerca de 90% dos indivíduos afetados^(5,51-53) e são distribuídas ao longo de toda a seqüência codificadora, porém muitas dessas mutações são localizadas no exon 8^(5,53). Não há uma clara relação fenótipo-genótipo na SW, porém alguns autores referem um fenótipo mais grave nos pacientes com proteína truncada e mutação na porção carboxi-terminal associada com surdez⁽⁵³⁾, ou ainda a presença de mutações inativadoras em ambos os alelos seriam associadas com um início mais precoce do Diabetes Mellitus⁽⁵⁾.

Em conclusão, o curso clínico da SW é variável e o entendimento de como alterações na função da wolframina resultam em diabetes e neurodegeneração é essencial para o desenvolvimento de terapias para prevenir ou atenuar as conseqüências dessa doença tão devastadora.

REFERÊNCIAS

1. Inukai K, Awata T, Inoue K, Kuihara S, Nakashima Y, Watanabe M, et al. Identification of a novel WFS1 mutation (AFF344-345ins) in Japanese patients with Wolfram syndrome. **Diabetes Res Clin Pract** 2005;69:136-41.
2. Wolfram DJ, Wagner HP. Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. **Mayo Clinic Proc** 1938;13:715-8.
3. Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. **Lancet** 1995;346:1458-63.
4. Kinsley BT, Swift M, Dumont RH, Swift RG. Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. **Diabetes Care** 1995;18:1566-70.
5. Giuliano F, Bannawarth S, Mannot S, Cano A, Chabrol B, Vialettes B, et al. Wolfram syndrome in French population: Characterization of novel mutations and polymorphism in the WFS1 Gene. **Hum Mutat** 2005;25:99-100.
6. Karasik A, O'Hara C, Srikanta S, Swift M, Soeldner JS, Kahn CR, et al. Genetically programmed selective islet β -cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. **Diabetes Care** 1989;12:135-8.
7. Blasi C, Pierelli F, Rispoli E, Sapanora M, Vingob E, Andreani D. Wolfram's syndrome: a clinical, diagnostic and interpretative contribution. **Diabetes Care** 1986;9:521-8.
8. Blasi C, Lulli P, Andreani D. HLA antigens in Wolfram (DIDMOAD) syndrome. **Lancet** 1983;ii:573.
9. Fishman L, Ehrlich RM. Wolfram syndrome: report of four cases and review of literature. **Diabetes Care** 1986;9:405-8.
10. Reis AF, Ferreira JG, Coifman R, Russo EMK, Moisés RCS, Dib SA. Síndrome de Wolfram: Relato de um caso, revisão da literatura e caracterização do diabetes mellitus associado. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1996;40:106-12.
11. Megighian D, Savastano M. Wolfram syndrome. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 2004;68:243-7.
12. Fontes BM, Chen J, Príncipe AH, Sallum JMF, Chicani CF. Síndrome de Wolfram – Relato de caso. **Arq Bras Oftalmol** 2004;67:961-4.

13. Cryns K, Pfister M, Pennings RJE, Bom SJH, Flothmann K, Caethoven G, et al. Mutations in the WFS1 Gene that causes low-frequency sensorineural hearing loss are small non-inactivating mutations. **Hum genet** 2002;110:389-94.
14. Al-Till M, Jarrah NS, Ajlouni KM. Ophtalmologic findings in fifteen patients with Wolfram syndrome. **Eur J Ophtalmol** 2002;12:84-8.
15. Cremers CWR, Wijdeveld PGAB, Pinckers AJLG. Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, hearing loss, diabetes insipidus, atonia of the urinary tract and bladder and other abnormalities (Wolfram syndrome). **Acta Paediatr Scand** 1997;264(suppl.):1-16.
16. Mayer UM, Rott HD, Böhles HJ. Observation concerning the age of onset and the nature of optic atrophy in Wolfram's syndrome (DIDMOAD). **Ophtalmic Paediatr Genet** 1985;3:155-7.
17. Barret TG, Bunday SE, Fielder AR, Good PA. Optic atrophy in Wolfram (DIDMOAD) syndrome. **Eye** 1997;11:882-8.
18. Simsek E, Simsek T, Tekgül S, Hosal S, Seyrantepe V, Aktan G. Wolfram (DIDMOAD) syndrome: a multidisciplinary clinical study in nine Turkish patients and review of the literature. **Acta Paediatr** 2003;92:55-61.
19. Dreyer M, Rüdiger HW, Bujara K, Herberhold C, Kühnau J, Maack P, et al. The Syndrome of Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness, and Other Anormalities (DIDMOAD-Syndrome):Two Affected Sibs and a Short Review of Literature (98 cases). **Klin Wochenschr** 1982;60:471-5.
20. Kinsely BT, Firth RG. The Wolfram syndrome: a primary neurodegenerative disorder with lethal potential. **Ir Med J** 1992;85:34-6.
21. Tekgul S, Oge O, Simsek E, Yordam N, Kendi S. Urological manifestations of the Wolfram syndrome: observations in 14 patients. **J Urol** 1999;161:616-7.
22. Najjar SS, Saiklay MG, Zaytoun GM, Abdelmooz A. Association of diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness: the Wolfram or DIDMOAD syndrome. **Arch Dis Child** 1985;60:823-8.
23. Page M McB, Asmal AC, EdwardsCR. Recessive inheritance of diabetes: the syndrome of diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness. **Q J Med** 1976;179:505-20.
24. Chu P, Staff WG, Morris JA, Polak JM. DIDMOAD syndrome with megacystic and megaureter. **Postgrad Med J** 1986;62:859-63.

25. Scolding NJ, Keller-Wood H, Shaw C, Shneerson J, Antoun N. Wolfram syndrome: hereditary diabetes mellitus with brainstem and optic atrophy. **Ann Neurol** 1996;39:352-60.
26. Rando TA, Horton JC, Layzer RB. Wolfram syndrome: evidence of a diffuse neurodegenerative disease by magnetic resonance imaging. **Neurology** 1992;42:1220-4.
27. Alicangolu R, Canbakan B, Yldiz N, Arikan E, Kundur H, Bahtiyar K, et al. DIDMOAD syndrome. **Wien Med Wochenschr** 1994;144:78-81.
28. Shannon P, Becker L, Deck J. Evidence of widespread axonal pathology in Wolfram syndrome. **Acta Neuropathol** 1999;98:304-8.
29. Gregorios JB. Wolfram's syndrome with schizophrenia and central hypoventilation: a neuropathological study. **J Neuropathol Exp Neurol** 1989;48:308-10.
30. Medlej R, Wasson P, Baz P, Azar S, Salti S, Loiselet J, et al. Diabetes Mellitus and Optic Atrophy: A Study of Wolfram Syndrome in the Lebanese Population. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89:1656-61.
31. Minton JAL, Rainbow LA, Ricketts C, Barrett TG. Wolfram Syndrome. **Rev Endocr Metab Disord** 2003;4:53-9.
32. Swift RG, Sadler DB, Swift M. Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. **Lancet** 1990;336:667-9.
33. Swift RG, Perkins DO, Chase CL, Sadler DB, Swift M. Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome. **J Psychiatry** 1991;148:775-9.
34. Fraser F, Gunn T. Diabetes melitus, diabetes insipidus and optic atrophy: An autosomal recessive syndrome? **J Med Genet** 1977;14:190-3.
35. Gunn T, Bortolussi R, Little JM, Andermann F, Fraser FC, Belmonte MM. Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, sensory nerve deafness, and diabetes insipidus – a syndrome. **J Pediatr** 1976;89:565-70.
36. Bunday S, Poulton K, Whitewell H, Curtis E, Brown IA, Fielder AR. Mitochondrial abnormalities in the DIDMOAD syndrome. **J Inherit Metab Dis** 1992;15:315-9.
37. Bunday S, Fielder AR, Poulton K. Wolfram syndrome: Mitochondrial disorder. **Lancet** 1993;342:1059-60.
38. Bu X, Rotter JL. Wolfram syndrome: A mitochondrial-mediated disorder? **Lancet** 1993;342:598-600.

39. Vora AJ, Lilleyman JS. Wolfram syndrome: Mitochondrial disorder. **Lancet** 1993;342:1059.
40. Barrientos A, Casademont J, Cardellach F, Volpini V, Solans A, Tolosa E, et al. Autosomal recessive Wolfram syndrome associated with an 8.5-kb mtDNA single deletion. **Am J Hum Genet** 1996;58:963-70.
41. Rotig A, Cormier V, Chatelain P, Francois R, Saudubray JM, Rustin P, et al. Deletion of mitochondrial DNA in a case of early-onset diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness (Wolfram syndrome, MIM 222300). **J Clin Invest** 1993;91:1095-98.
42. Polymeropoulos MH, Swift RG, Swift M. Linkage of the gene for Wolfram syndrome to markers on short arm of chromosome 4. **Nat Genet** 1994;8:95-97.
43. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, et al. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). **Nat Genetics** 1998;20:143-8.
44. Strom TM, Hortnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, et al. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. **Hum Molec Genet** 1998;7:2021-28.
45. El-Shanti H, Lidral AC, Jarrah N, Druhan L, Ajlouni K. Homozygosity mapping identifies and additional locus for Wolfram syndrome on chromosome 4q. **Am J Hum Genet** 2000;66:1229-36.
46. Hofman S, Philbrook C, Gerbitz KD, Bauer MF. Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 product. **Hum Mol Genet** 2003;12:2003-12.
47. Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M. Wolframin Expression Induces Novel Ion Channel Activity in Endoplasmic Reticulum Membranes and Increases Intracellular Calcium. **J Biol Chem** 2003;278:52755-62.
48. Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, et al. WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. **Hum Mol Genet** 2001;10:477-84.
49. Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Inoue H, Tanizawa Y, Takeda S, et al. Disruption of the WFS1 gene causes diabetes in mice due to progressive loss of islet β -cells. **Diabetes** 2003;52(suppl. 1):A42.

50. McBain S, Morgan NG. Functional effects of expression of wolframin-antisense transcripts in BRIN-BD11 β -cells. **Biochem and Biophys Res Commun** **2003**;307:684-8.
51. Colosimo A, Guida V, Rigoli L, Di-Bella C, De-Luca A, Briuglia S, et al. Molecular detection of novel WFS1 mutations in patients with Wolfram syndrome by a DHPLC-based assay. **Hum Mutat** **2003**;21:622-629.
52. Hardy C, Khanin F, Torres R, Scott-Brown M, Seller A, Poulton J, et al. Clinical and molecular genetic analyses of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. **Am J Hum Genet** **1999**;65:1279-1290.
53. Smith CJA, Crock PA, King BR, Meldrum CJ, Scott RJ. Phenotype-Genotype Correlations in a Series of Wolfram Syndrome Families. **Diabetes Care** **2004**;27:2003-09.

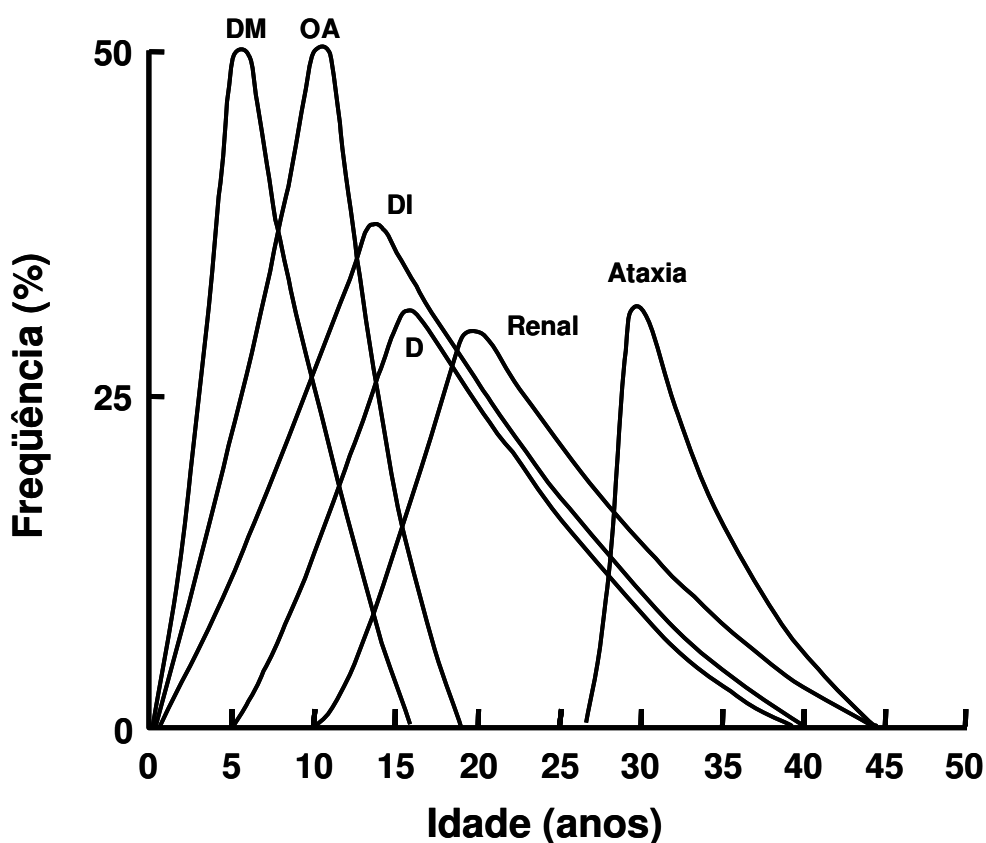


Figura 1: História natural da Síndrome de Wolfram. O pico de cada curva representa a idade média de aparecimento das complicações e a intersecção com o eixo da abscissa o intervalo de aparecimento. DM: diabetes mellitus; AO: atrofia óptica; DI: diabetes insipidus; D: surdez; Renal: anormalidades do trato renal; Ataxia: anormalidade neurológicas. (Reproduzido de Barret TG et al. ⁽³⁾, com permissão de Elsevier).

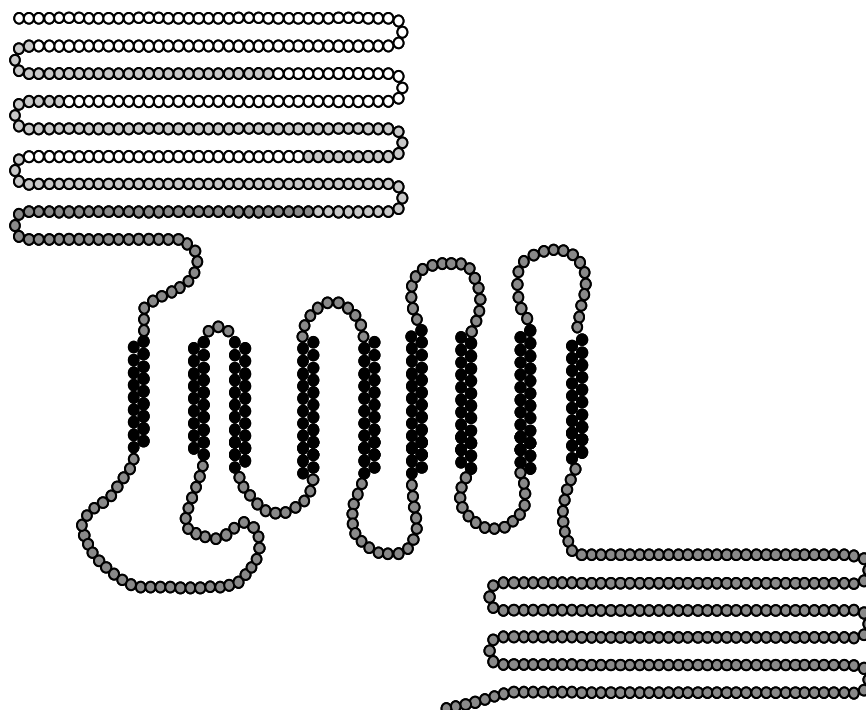


Figura 2: Estrutura hipotética da proteína wolframina demonstrando as porções amino e carboxi terminal e os nove domínios transmembrana. Círculos cinza indicam domínios hidrofílicos e círculos pretos indicam os domínios transmembrana (Adaptado de Hardy et al.,⁽⁵²⁾)

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram definir o espectro de mutações no gene *WFS1* em portadores da síndrome de Wolfram na população brasileira, e avaliar uma possível correlação fenótipo-genótipo nesses pacientes.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A Síndrome de Wolfram é uma doença rara e, em consequência o número de indivíduos disponíveis para avaliação é limitado. Portanto, para termos um número representativo de indivíduos portadores da SW, recrutamos pacientes procedentes de diferentes regiões do país. Na Figura 2 demonstramos as localizações de origem dos pacientes incluídos nesse estudo. Foram avaliados 26 pacientes pertencentes a 18 famílias. Apresentamos no Artigo 2 os dados obtidos e, em anexo, a história de cada indivíduo assim como as respectivas mutações identificadas.



Figura 2: Procedência das famílias estudadas com portadores da Síndrome de Wolfram

Identification of Novel Mutations of the *WFS1* Gene in Brazilian Patients with Wolfram Syndrome

Maria Regina R Gasparin¹ MD PhD; Felipe Crispim¹ ; Sílvia L Paula ² MD; Maria Beatriz S. Freire³ MD PhD; Ivaldir S. Dalbosco⁴ MD PhD; Thais Della Manna⁵ MD PhD; João Eduardo N. Salles⁶ MD PhD; Fábio Gasparin⁷ MD; Aléxis Guedes¹ MD; João M Marcantonio⁸ MD; Márcio Gambini⁹ MD, Camila P. Salim¹ MD and Regina S. Moisés¹ MD PhD

1. Division of Endocrinology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil
2. Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil;
3. Medical School of Jundiaí, Jundiaí, Brazil;
4. University Foundation of Rio Grande, Rio Grande, Brazil;
5. Pediatric Endocrinology Unit, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
6. Medical School of Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brazil;
7. Department of Ophthalmology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;
8. Maringá, PR, Brazil;
9. Jundiaí, SP, Brazil

Address correspondence and reprint requests to:

Regina S. Moisés, MD, PhD

Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Disciplina de Endocrinologia,

Rua Botucatu, 740 – 2o. andar,

04034-970 São Paulo, SP, Brazil,

Phone: +55 11 5576-4229, Fax: +55 11 5579-6636

E-mail: rmoises@unifesp.br

This study was supported by a grant from the State of São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP)

Running title: Wolfram syndrome and *WFS1* mutations

Key words: Wolfram syndrome, *WFS1* gene, DIDMOAD, monogenic diabetes

Word count: 3,207 words, 1 figure, 2 tables

Published in: **Eur J Endocrinol. 2009;160:309-16.**

Abstract

Objective: Wolfram syndrome (WS) is a rare, progressive, neurodegenerative disorder with an autosomal recessive pattern of inheritance. The gene for WS, *WFS1*, was identified on chromosome 4p16 and most WS patients carry mutations in this gene. However, some studies have provided evidence for genetic heterogeneity and the genotype-phenotype relationships are not clear. Our aim was to ascertain the spectrum of *WFS1* mutations in Brazilian patients with Wolfram syndrome and to examine the phenotype-genotype relationships in these patients.

Design and Methods: Clinical characterization and analyses of the *WFS1* gene were performed in 27 Brazilian patients with Wolfram syndrome from 19 families.

Results: We identified 15 different mutations in the *WFS1* gene in 26 patients, among which 9 are novel. All mutations occurred in exon 8, except for one missense mutation which was located in exon 5. Although, we did not find any clear phenotype-genotype relationship in patients with mutations in exon 8, the homozygous missense mutation in exon 5 was associated with a mild phenotype: onset of diabetes mellitus and optic atrophy during adulthood with good metabolic control being achieved with low doses of sulfonylurea.

Conclusions: Our data show that *WFS1* is the major gene involved in WS in Brazilian patients and most mutations are concentrated in exon 8. Also, our study increases the spectrum of *WFS1* mutations. Although no clear phenotype-genotype relationship was found for mutations in exon 8, a mild phenotype was associated with a homozygous missense mutation in exon 5.

Introduction

Wolfram syndrome (WS) is a rare, progressive, neurodegenerative disorder with an autosomal recessive pattern of inheritance. The minimal diagnostic criteria for WS are non-autoimmune diabetes mellitus and optic atrophy; but other frequent findings are cranial diabetes insipidus, sensorineural deafness, urinary tract abnormalities, psychiatric illness, ataxia, peripheral neuropathy and other endocrine disturbances.

The gene for WS, *WFS1*, was identified on chromosome 4p16 by two independent groups (1,2). This gene consists of eight exons, spans 33.4kb of genomic DNA and encodes an 890-amino-acid protein named wolframin. Wolframin is a component of the unfolded protein response and has an important function in maintaining homeostasis in the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells (3). Since its identification, *WFS1* gene mutations have been identified in most WS patients. However, some studies have provided evidence for genetic heterogeneity (4, 5). In fact, very recently Amr et al. showed that a mutation in a zinc-finger gene, *ZCD2*, also causes WS (6).

In the present study we aimed to ascertain the spectrum of *WFS1* mutations in Brazilian WS patients and to examine the phenotype-genotype relationships in these patients.

Subjects and Methods

The study population comprised 27 individuals (15 females and 12 males, aged 12 to 39 years old) from 19 unrelated families. The intra-family cases were all siblings. The criteria to diagnose WS were diabetes mellitus and bilateral optic atrophy. Patients were recruited from different Brazilian regions with the main referral sources being university hospitals.

Patients were submitted to an interview to ascertain the family history and medical history of diabetes, visual loss and associated manifestations. Detailed clinical examination was also performed. Standardized ophthalmologic evaluations with the pupils dilated by specialized ophthalmologists and ultrasonography of the urinary tract were performed in all participants. Diabetic nephropathy was assessed

by 12-hour urinary albumin excretion measurement and plasma creatinine concentrations. Audiological examination (pure-tone, speech and impedance audiometry) was performed in 23 cases. Diabetes insipidus was investigated using the water deprivation test in patients whose urine specific gravity was less than 1010.

Free thyroxin (FT4), thyroid-stimulating hormone (TSH), prolactin, cortisol, growth hormone (GH), testosterone (in postpuberal boys), estradiol (in postpuberal girls), LH and FSH (in postpuberal patients) were measured in most patients. Brain magnetic resonance or computed tomography was performed in 12 patients.

Blood samples were obtained from each subject and genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a commercial kit (Puregene DNA Isolation Kit, Gentra System, Minneapolis, MN, USA). Exons 2 to 8 and the intron-exon boundaries of the *WFS1* gene were amplified by PCR using twelve pairs of primers. The non-coding exon 1 was sequenced only when no mutations were found in the coding region. Exons 1-7 were amplified using set of primers as previously published (7). Exon 8, which was divided into seven regions, was amplified using primer pairs as described by Strom et al (2). The PCR products were directly sequenced using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit version 3.1 and analyzed on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). Sequence changes of heterozygous frameshift mutations were determined by cloning the PCR product using TOPO TA Cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequencing clones derived from both alleles.

The degree of functional impairment by novel amino acid substitutions was quantified using the MAPP (Multivariate Analysis of Protein Polymorphism) software (8). This method exploits the physicochemical variations of wild type amino acid residues, missense variants and phylogenetic conservation. We used an alignment of six orthologues (*Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus tropicalis* and *Drosophila melanogaster*).

The nomenclature recommended by the Human Genome Variation Society was used for the description of mutations. Numbering of nucleotides: the A of the ATG of the initiator Met codon was denoted as +1 (Gen Bank NM_006005) and amino acids were numbered according to Gen Bank accession number NP_005996.1.

The presence of the 3243 A-to-G transition in the mitochondrial tRNA Leu (UUR) gene was determined by polymerase chain reaction, Apa I digestion and acrylamide gel electrophoresis as previously reported (9). Bands were visualized by ethidium bromide staining. In this diagnostic system, the lower limit of detection for A3243G heteroplasmy is 1.0% (9). This procedure was performed in patients in whom no mutations were detected in *WFS1*.

One hundred chromosomes from 50 unrelated non-diabetic individuals (fasting plasma glucose < 100 mg/dL) were used as controls.

Statistical analysis: All data are shown as means \pm standard deviation (SD). Differences in continuous variables between the groups were evaluated by the unpaired Student t-test. Differences between types of mutation and age at onset of diabetes were tested by analysis of variance (ANOVA). A p-value of < 0.05 was considered statistically significant.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Paulista Medical School, Federal University of São Paulo, and all participants were informed about the aims of the study and gave their written consent.

Results

Clinical features.

Twenty-seven patients (P1-P27) from 19 unrelated families (F1-F19) were studied. They were from the five Brazilian regions: north (F14), northeast (F13, F18), central-west (F5, F10), southeast (F1 to F4, F6, F7, F11, F12, F15, F19) and south (F8, F9, F16, F17). Consanguinity was reported in 9 families (47.4%) and one proband was an adopted girl with unknown family history. Pedigrees of the families are shown in Figure 1 and the main clinical features of the affected individuals are shown in Table 1.

Diabetes was diagnosed at a mean age of 6.7 ± 5.0 years old (range: 1.5-27 years) and for 25 patients (92.6%) it was the first manifestation of WS. In 24 cases (88.9%) diabetes was diagnosed in the first decade of life and in only one patient in the third decade. There was no significant difference in the age at onset of diabetes

between siblings ($p=0.35$). All patients, except one (P26), were treated with insulin from onset. Diabetic retinopathy (non-proliferative and proliferative) was present in 5 of the 27 patients (18.5%) all of whom had suffered from diabetes for more than 15 years. However, the mean duration of diabetes was not different in patients with and without retinopathy (18.2 ± 2.95 years vs. 17.2 ± 5.10 years, $p=0.66$). Overt nephropathy was observed in two patients, one of whom had end-stage renal failure requiring hemodialysis. Both had proliferative retinopathy.

Optic atrophy was diagnosed at mean age of 11.8 ± 3.8 years (range: 7-20 years) and all patients had abnormal visual acuity.

Twenty-three patients were submitted to audiography with abnormal results in all cases. In spite of this, 7 patients had no clinical evidence of hearing loss, while 11 required hearing aids. Urinary tract abnormalities were observed in 25 patients (92.6%). The findings of the ultrasonography examinations included incomplete bladder emptying, increased bladder capacity, trabeculated bladder, mild to severe bilateral pyelocaliceal ectasia and mild to severe bilateral hydroureteronephrosis. Thirteen patients (48%) needed intermittent bladder catheterization.

Diabetes insipidus was present in 11 (40.7%) patients. All were controlled with intranasal antidiuretic hormones.

Four of the twelve (33.3%) male patients had hypergonadotropic hypogonadism and 34% of the female patients had irregular menstrual cycles and/or delayed menarche. The four cardinal components of WS (diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy and deafness) were found in 11 patients (40.7%).

Mutations of the WFS1 gene:

We identified 15 different mutations in 26 patients (26/27), among which 9 are novel (Table 2). The novel mutations were: c.1355_1370dup16 (p.Ala460HisfsX88); c.1234_1237delGTCT (p.Val412SerfsX29); c.1145T>C (p.Leu382Pro); c.876dupC (p.Leu293ProfsX13); c.1991T>C (p.Leu664Arg); c.2007T>G (p.Tyr669X); c.2643_2646delCTTT (p.Phe882SerfsX69); c.2105G>A (p.Gly702Asp); c.472G>A (p.Glu158Lys). None of these novel mutations were found in the 100 control chromosomes, and within families they were only present as homozygous mutations in affected individuals. Furthermore, all novel missense

variants (p.Glu158Lys, p.Leu 382Pro, p.Leu664Arg and p.Gly702Asp) presented high MAPP scores (19.98; 36.32; 33.02 and 35.86 respectively) thus they are envisaged as deleterious to protein function.

The c.1355_1370dup16 (p.Ala460HisfsX88) is a 16-bp duplication in exon 8 found as heterozygous in patient P1, as well as in his mother and twin sister. This mutation causes a frameshift which results in a premature stop codon truncating the protein at amino acid residue 541. As a result 40% of the wolframín is lacking.

The c.1234_1237delGTCT (p.Val412SerfsX29) is a 4-bp deletion in exon 8 identified as heterozygous in siblings P4 and P5 and their mother. This frameshift mutation results in a premature stop codon, predicting a truncated protein of 441 amino acids (49.6% shorter than the wild type wolframín) with only the hydrophilic amino terminus and three transmembrane domains.

The c.1145T>C (p.Leu382Pro) is a missense mutation in exon 8 causing the substitution of the amino acid leucine by proline. It was found as heterozygous in patient P8.

The c.876dupC (p.Leu293ProfsX13) is a single base duplication at the beginning of exon 8 causing a frameshift which results in an early stop codon. The predicted truncated protein lacks the entire transmembrane domains and the hydrophilic carboxy tail. This mutation was identified as homozygous in siblings P17 and P18 and as heterozygous in their parents.

The c.1991T>C (p.Leu664Arg) is a missense mutation located in exon 8 where the amino acid arginine substitutes the amino acid leucine. It was identified in siblings P19 and P20 as homozygous, and in their parents as heterozygous.

The c.2007T>G (p.Tyr669X) is a nonsense mutation in exon 8 which predicts a truncated protein with only 669 residues. It was found as homozygous in siblings P21 and P22, and as heterozygous in their mother and a paternal aunt.

The c.2643_2646delCTTT (p.Phe882SerfsX69) is a 4-bp deletion in exon 8 resulting in a frameshift and termination signal at nucleotide 2854. The predicted sequence of the mutant protein is 61 amino acids longer than the wild type protein. This mutation was found as heterozygous in siblings P23 and P24, as well as in their father and older sister.

The c.2105G>A (p.Gly702Asp) is a missense mutation in exon 8, resulting in the substitution of glycine by aspartic acid at codon 702. It was found as heterozygous in patient P25 and it is probably paternally inherited, as the patient's mother harbors the second mutation found in P25.

The c.472G>A (p.Glu158Lys) is a missense mutation in exon 5, which causes the substitution of glutamic acid by lysine at codon 158. This mutation was found in homozygous state in patient P26. DNA samples from his parents were not available, but consanguinity was reported.

The nonsense mutation p.Cys647X, found as heterozygous in patient P2, was previously reported in one Brazilian boy (10).

No mutations were detected in patient P3, who only carried five polymorphisms: [c.684G>C (p.=); c.997A>G (p.Ile333Val); c.1185T>C (p.=); c.1500T>C (p.=); c.1726G>A (p.Gly576Ser)] previously described (11). Complete cDNA sequencing was performed, including the non-coding exon 1. This patient, born of consanguineous parents, developed diabetes mellitus and optic atrophy at age 14 followed by a hearing deficit and urinary tract dilatation. The water deprivation test was performed and a normal response was obtained. The presence of the A3243G mutation in the tRNA Leu (UUR) gene was investigated but no mutation was found. A detailed description of this patient has previously been reported (12).

Causative mutations were homozygous in 14 cases (53.8%) and compound heterozygous in the other 12 cases. All mutations occurred in exon 8, except for one missense mutation located in exon 5, which was identified in patient P26. This patient showed a mild phenotype with optic atrophy and diabetes mellitus developing at ages 19 and 27, respectively. Since the diagnosis of diabetes twelve years ago, he has been treated with low-dose sulfonylurea tablets showing good metabolic control.

The most frequent mutation in this study was c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29) identified in 8 families, corresponding to 44.4% of the pedigrees with *WFS1* mutations. This mutation causes a frameshift which results in a stop codon truncating the protein at residue 441. As a consequence, 49.5% of the wolframin is lost, including the majority of transmembrane domains and the entire hydrophilic carboxy tail.

Also, in our patient series various polymorphisms, composed of silent variants or conservative amino acid changes, were detected, all of which have previously been reported (13-17).

Phenotype-genotype relationships:

Possible phenotype-genotype relationships were investigated. The age at onset of diabetes mellitus was chosen as an indicator of disease severity. Missense mutations and 3 bp-deletions, resulting in a deletion of one amino acid were considered non-inactivating mutations. Nonsense, frameshift mutations, deletions and insertions of more than 3 bp were considered inactivating mutations (11). Among the 26 patients with *WFS1* mutations, 13 carried two inactivating, 6 carried one inactivating and one non-inactivating and 7 carried 2 non-inactivating mutations. Their mean ages at onset of diabetes were 5.9 ± 2.9 years; 5.1 ± 2.5 years and 8.5 ± 8.4 years, respectively ($p=ns$). However, the only patient harboring mutations in both alleles outside exon 8 showed a mild phenotype: the onset of diabetes mellitus and optic atrophy was during adulthood and good metabolic control was achieved with low doses of sulfonylurea. A hearing deficit was not clinically evident and diabetes insipidus was absent.

Discussion

Since the cloning of the *WFS1* gene, genetic screening of WS patients has been performed mostly in Caucasian individuals (7,14,15,18). The Brazilian population is mostly of Portuguese origin, miscegenated with a variety of other populational groups including Italians, Spaniards, Japanese, Africans, and native Indians. Thus, the Brazilian population has diverse ethnicity. In this study, one of the largest WS series studied, we present a detailed clinical evaluation and genetic analysis of the *WFS1* gene in 27 Brazilian patients. These individuals are from various regions of the country and should be representative of WS patients in Brazil. *WFS1* was found to be the major gene in our WS population with 15 different mutations in 26 patients; only one patient (P3) had no mutations. This patient had a typical WS phenotype presenting with diabetes mellitus, optic atrophy, hearing loss and urinary tract dilatation. The possibility of mutations in the promoter and regulatory regions of *WFS1* cannot be ruled out. Another condition that shares some

clinical similarities with WS is maternally inherited diabetes and deafness associated with an A3243G mutation in the mitochondrial tRNA Leu (UUR) gene. However, we did not find A3243G mutation in P3. Recently, Amr et al. identified mutations in the *ZCD2* gene as a cause of WS in three large consanguineous Jordanian families (6).

The affected individuals presented some particular features such as upper gastrointestinal ulceration with bleeding tendency secondary to a platelet aggregation defect and absence of diabetes insipidus (5,6). Interestingly, similar to the patients reported in the Jordanian study, diabetes insipidus was absent in patient P3, but bleeding tendency was not observed. Further investigations will indicate if patient P3 harbors *ZCD2* gene mutations.

Identified mutations consisted of insertions, deletions, nonsense and missense and were concentrated in the largest exon, exon 8, similar to other reports (1, 2, 7, 15, 18). Besides exon 8, we found a novel homozygous missense mutation in exon 5 in one patient. Mutations in exon 5 are infrequent; only a few cases have been reported in prior publications (2, 7, 15, 18) with all of them being compound heterozygous with mutations in exon 8.

The most frequent mutation in this study was a 4-bp deletion resulting in a frameshift and premature stop codon [c.1230_1233del CTCT (p.Val 412SerfsX29)] found in 8 WS pedigrees. These families come from distinct regions of Brazil and are apparently unrelated. However, additional analysis would be needed to further evaluate a potential founder effect in these families. This mutation has previously been reported in French (14) and Italian pedigrees (7,19). Prior studies have shown common mutations in certain groups, such as in Spanish and Italian populations (7, 19, 20), but not in others (14).

We identified nine novel mutations in our series. They were presented as homozygous in 4 pedigrees, all with reported consanguinity. These mutations are likely to be pathogenic since they were absent in 100 control chromosomes, occur in evolutionarily conserved residues and were present as homozygous only in affected subjects.

In our study most patients presented with diabetes mellitus within the first decade of life (median age: 6 yr) followed by optic atrophy (median age: 11 yr). These findings are in agreement with previously reported series, particularly a large

UK nationwide study of 45 patients where diabetes mellitus presented at a median age of 6 years old and optic atrophy at 10 years old (21).

Diabetes insipidus was found in 40.7% of our patients and the median age of diagnosis was 14.5 years (range 3-24 yr). This proportion is lower than some prior reports (21-23) but not others (2,24). Medlej et al., studying the Lebanese population, performed water deprivation tests in all patients and found partial or complete diabetes insipidus in 87% of cases, with median age of onset of polyuria at 9 years (range 4-26 yr) (23). Since in our series the water deprivation test was not performed in all patients, we cannot exclude the possibility of some undiagnosed cases. Urinary tract abnormalities were present in nearly all of our patients, as described in other published series (22). However, lower prevalences have also been reported (21, 25), indicating clinical heterogeneity. The urinary tract abnormalities associated with WS are likely to be due to degeneration of innervation of the ureters and bladder. It is unclear whether the high urine output associated with diabetes mellitus and diabetes insipidus contribute to renal tract dilatation. Page et al. reported an improvement in dilatation with the treatment of diabetes insipidus (26).

Audiography showed abnormalities in 100% of the patients in whom it was performed, although 7 patients were asymptomatic. The prevalence of hearing loss or abnormal audiography has been reported to be between 39 and 100% (21, 22, 27); probably representing differences in ascertainment. The audiological defect seen in these patients is a progressive bilateral neurosensorial hearing loss that first affects high frequencies.

The clinical data obtained were analyzed for phenotype-genotype correlation. As previously stated by Cryns et al. (11), mutations are described as non-inactivating or inactivating based on the type of mutation since no functional studies are available to date. The age at onset of diabetes mellitus was chosen as an indicator of disease severity as it is much easier to detect diabetes early; while for the other components of WS, such as diabetes insipidus and audiological and neurological findings, the patients may not notice the symptoms and so their presence may be underestimated. Considering mutations in exon 8, we found no significant differences in the mean age at onset of diabetes and the type of mutation. This lack of relationship is exemplified in family 14 where the affected individuals are homozygous for a missense mutation and the ages at onset of diabetes were very early (2 and 4 years). Similarly, Hardy et

al., in a national UK cohort, found no clear correlations between any of the observed mutations and disease severity (15). However, Cano et al., studying French patients and combining his results with those of five published studies, including the data of Hardy et al., found that the presence of two inactivating mutations predisposed patients to an earlier age of onset of both diabetes mellitus and optic atrophy (24). On the other hand, we observed a milder phenotype in a patient carrying a homozygous missense mutation in exon 5. He is the only patient in our series who developed diabetes mellitus as an adult and has received long-term treatment with oral hypoglycaemic drugs. Delayed expression of Wolfram Syndrome has been previously reported. Giuliano et al noted an atypical phenotype in a patient whose *WFS1* coding region had only one mutation identified (14).

In addition, a rare form of autosomal dominant transmission of diabetes mellitus, deafness, optic atrophy and no other manifestations of Wolfram disease was associated with the E864K mutation in two families (28, 29). Thus, the location of *WFS1* mutations also seems important to determine the severity of disease. Future studies will determine which parts of wolframin are important for biological function.

In summary, here we present the first molecular characterization of Brazilian WS patients. Our data show that *WFS1* is the most common gene involved in WS of Brazilian patients with most mutations being concentrated in exon 8. Also, our study increases the spectrum of *WFS1* mutations. A common 4-bp deletion of nucleotides 1230-1233 was identified, indicating that screening studies in our population should begin with this region. Although no clear phenotype-genotype relationships were found in exon 8, a mild phenotype was associated with a homozygous missense mutation in exon 5.

Declaration of Interest:

There is no conflict of interest.

This study was supported by State of São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, grant # 05/01590-0)

Acknowledgments:

The authors are grateful to Magnus R. Dias da Silva and Gustavo Guimarães for their help in MAPP analysis. We also thank the families for their participation in the study.

References

1. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, Mueckler M, Marshall H, Donis-Keller H, Crock P, Rogers D, Mikuni M, Kumashiro H, Higashi K, Sobue G, Oka Y & Permutt MA. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genetics* 1998 **20** 143-148
2. Strom TM, Hortnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD & Meitinger T. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin), coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 1998 **7** 2021-2028
3. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y & Urano F. WFS1 Is a Novel Component of the Unfolded Protein Response and Maintains Homeostasis of the Endoplasmic Reticulum in Pancreatic β Cells. *J Biol Chem* 2005 **280** 39609–39615
4. Collier DA, Barrett TG, Curtis D, Macleod A, Arranz MJ, Maassen JA & Bunday S. Linkage of Wolfram syndrome to chromosome 4p16.1 and evidence for heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1996 **59** 855-863
5. El-Shanti H, Lidral AC, Jarrah N, Druhan L & Ajlouni K. Homozygosity mapping identifies an additional locus for Wolfram syndrome on chromosome 4q. *Am J Hum Genet* 2000 **66** 1229-1236
6. Amr S, Heisey C, Zhang M, Xia XJ, Shows KH, Ajlouni K, Pandya A, Satin LS, El-Shanti H & Shiang R. A homozygous mutation in a novel zinc-finger protein, ERIS, is responsible for Wolfram syndrome 2. *Am J Hum Genet* 2007 **81** 673-683
7. Stone EA & Sidow A. Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Res* 2005 **15** 978-986
8. Zen PR, Pinto LL, Schwartz IV, Barrett TG & Paskulin G. Report of a Brazilian patient with Wolfram Syndrome. *J Pediatr (Rio J)* 2002 **78** 529-532
9. Reis AF, Ferreira JG, Coifman R, Russo EMK, Moisés RCS & Dib S: Síndrome de Wolfram: Relato de um Caso, Revisão da Literatura e Caracterização do Diabetes Mellitus Associado. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 40:106-112, 1996

10. Cryns K, Sivakumaran TA, Van den Ouweland JM, Pennings RJ, Cremers CW, Flothmann K, Young TL, Smith RJ, Lesperance MM & Van Camp G. Mutational spectrum of the WFS1 gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease. *Hum Mutat* 2003 **22** 275-287
11. Hardy C, Khanim F, Torres R, Scott-Brown M, Seller A, Poulton J, Collier D, Kirk J, Polymeropoulos M, Latif F & Barrett T. Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am J Hum Genet* 1999 **65** 1279-1290
12. van Den Ouweland JM, Cryns K, Pennings RJ, Walraven I, Janssen GM, Maassen JA, Veldhuijzen BF, Arntzenius AB, Lindhout D, Cremers CW, Van Camp G & Dikkeschei LD. Molecular characterization of WFS1 in patients with Wolfram syndrome. *J Mol Diagn* 2003 **5** 88-95
13. Colosimo A, Guida V, Rigoli L, Di-Bella C, De-Luca A, Briuglia S, Stuppia L, Salpietro DC & Dallapiccola B. Molecular detection of novel WFS1 mutations in patients with Wolfram syndrome by a DHPLC-based assay. *Hum Mutat* 2003 **21** 622-629
14. Giuliano F, Bannwarth S, Monnot S, Cano A, Chabrol B, Vialettes B, Delobel B, French Group of WS & Paquis-Flucklinger V. Wolfram syndrome in French population: characterization of novel mutations and polymorphisms in the WFS1 gene. *Hum Mutat* 2005 **25** 99-100
15. Tessa A, Carbone I, Matteoli MC, Bruno C, Patrono C, Patera IP, De Luca F, Lorini R & Santorelli FM. Identification of novel WFS1 mutations in Italian children with Wolfram syndrome. *Hum Mutat* 2001 **17** 348-349
16. Gomez-Zaera M, Strom TM, Rodriguez B, Estivill X, Meitinger T & Nunes V. Presence of a major WFS1 mutation in Spanish Wolfram syndrome pedigrees. *Mol Genet Metab* 2001 **72** 72-81
17. Barrett TG, Bunday SE & Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 1995 **346** 1458-1463

18. Simsek E, Simsek T, Tekgul S, Hosal S, Seyrantepe V & Aktan G. Wolfram (DIDMOAD) syndrome: a multidisciplinary clinical study in nine Turkish patients and review of the literature. *Acta Paediatr* 2003 **92** 55-61
19. Medlej R, Wasson J, Baz P, Azar S, Salti I, Loiselet J, Permutt A & Halaby G. Diabetes mellitus and optic atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 1656-1661
20. Cano A, Rouzier C, Monnot S, Chabrol B, Conrath J, Lecomte P, Delobel B, Boileau P, Valero R, Procaccio V, Paquis-Flucklinger V, French Group of Wolfram Syndrome & Vialettes B. Identification of novel mutations in WFS1 and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Am J Med Genet A* 2007 **143** 1605-1612
21. Kinsley BT, Swift M, Dumont RH & Swift RG. Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care* 1995 **18** 1566-1570
22. Page MM, Asmal AC & Edwards CR. Recessive inheritance of diabetes: the syndrome of diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness. *Q J Med.* 1976 **45** 505-520
23. Cremers CWRJ, Wijdeveld PGAB & Pinckers AJLG. Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, hearing loss, diabetes insipidus, atonia of the urinary tract and bladder, and other abnormalities (Wolfram syndrome). A review of 88 cases from the literature with personal observations on 3 new patients. *Acta Paediatr Scand* 1977 **Suppl** 1-16

Figure Legend






Figure 1: Pedigrees of Wolfram syndrome families. +, presence of *WFS1* mutation; -, absence of *WFS1* mutation;  Wolfram Syndrome;  Diabetes Mellitus;  Impaired Glucose Tolerance;  Glucose Tolerance status not determined;  Normal Glucose Tolerance.

Table 1: Characteristics of the study population

Family	Patient	Sex (M/ F)	Age (years)	Consanguinity ^a	Age at diagnosis (years) ^b					Neurological abnormalities	Other complications
					DM	AO	DI	D	Urinary tract abnormalities		
F1	P1	M	27	-	3	12	3	12	17	Peripheral polyneuropathy; Ataxia; Cortical atrophy; Mild sleep apnea; Erectile dysfunction.	Hypogonadism; Mania
F2	P2	F	†27	-	3	8	12	8	24	Mild mental retardation; Cortical atrophy	Delayed puberty; Hypothyroidism
F3	P3	M	†31	+	14	14	-	+	+	Cortical atrophy	Renal failure; Non-proliferative retinopathy
F4	P4	M	25	-	3,5	10	-	14	24	-----	Hypertension; Hypercholesterole mia
F4	P5	F	25	-	3,5	20	-	20	24	-----	-----
F5	P6	M	22	-	9	14	14	14	14	Nystagmus	-----
F6	P7	F	19	+	6	15	18	12	17	-----	Hypertension
F7	P8	F	14	-	6	11	10	14	+	Restless Legs Syndrome; peripheral neuropathy	Depression
F8	P9	F	27	-	8	8	-	NT	+	-----	-----
F9	P10	M	35	-	8	16	15	10	23	Erectile dysfunction	Hypogonadism; Depression
F10	P11	M	27	+	9	9	24	19	+	-----	Cataract
F10	P12	F	22	+	7	12	+	+	+	-----	-----
F10	P13	F	†25	+	5	11	14	14	16	-----	-----
F11	P14	F	27	-	7	20	20	25	-	-----	-----
F12	P15	M	30	+	7	11	17	20	+	-----	-----
F12	P16	M	24	+	11	11	-	NT	+	-----	-----
F13	P17	F	21	+	3	9	-	19	14	-----	Depression Depression; Anorexia
F13	P18	F	18	+	3	10	-	10	9	-----	Non-proliferative retinopathy Menarche 16.5 years Severe proliferative retinopathy, neovascular glaucoma ; diabetic nephropathy
F14	P19	F	25	+	2	15	-	23	20	-----	-----
F14	P20	F	13	+	4	9	-	11	9	-----	-----
F15	P21	M	26	+	8	13	-	26	13	Mild mental retardation	Hypogonadism; Cataract; Non- proliferative retinopathy; hypertelorism; Low set posterior rotated ears Hypogonadism; Cataract;
F15	P22	M	†24	+	6	13	-	NT	17	Mild mental retardation	Non-proliferative retinopathy Hypertelorism; Low set posterior rotated ears Menarche 15 years
F16	P23	F	23	-	8	7	-	18	-	-----	Menarche 15 years
F16	P24	F	26	-	8	8	-	21	18	-----	Menarche 15 years
F17	P25	F	19	-	2	7	-	14	7	Ataxia; Polyneuropathy	Menarche 16 years Glaucoma, Cataract
F18	P26	M	39	+	27	19	-	39	33	Erectile dysfunction	-----
F19	P27	M	12	+	1,5	7	-	NT	7	-----	-----

† age of death;

DM: Diabetes Mellitus; DI: Diabetes Insipidus; OA: Optic Atrophy; D: Deafness.

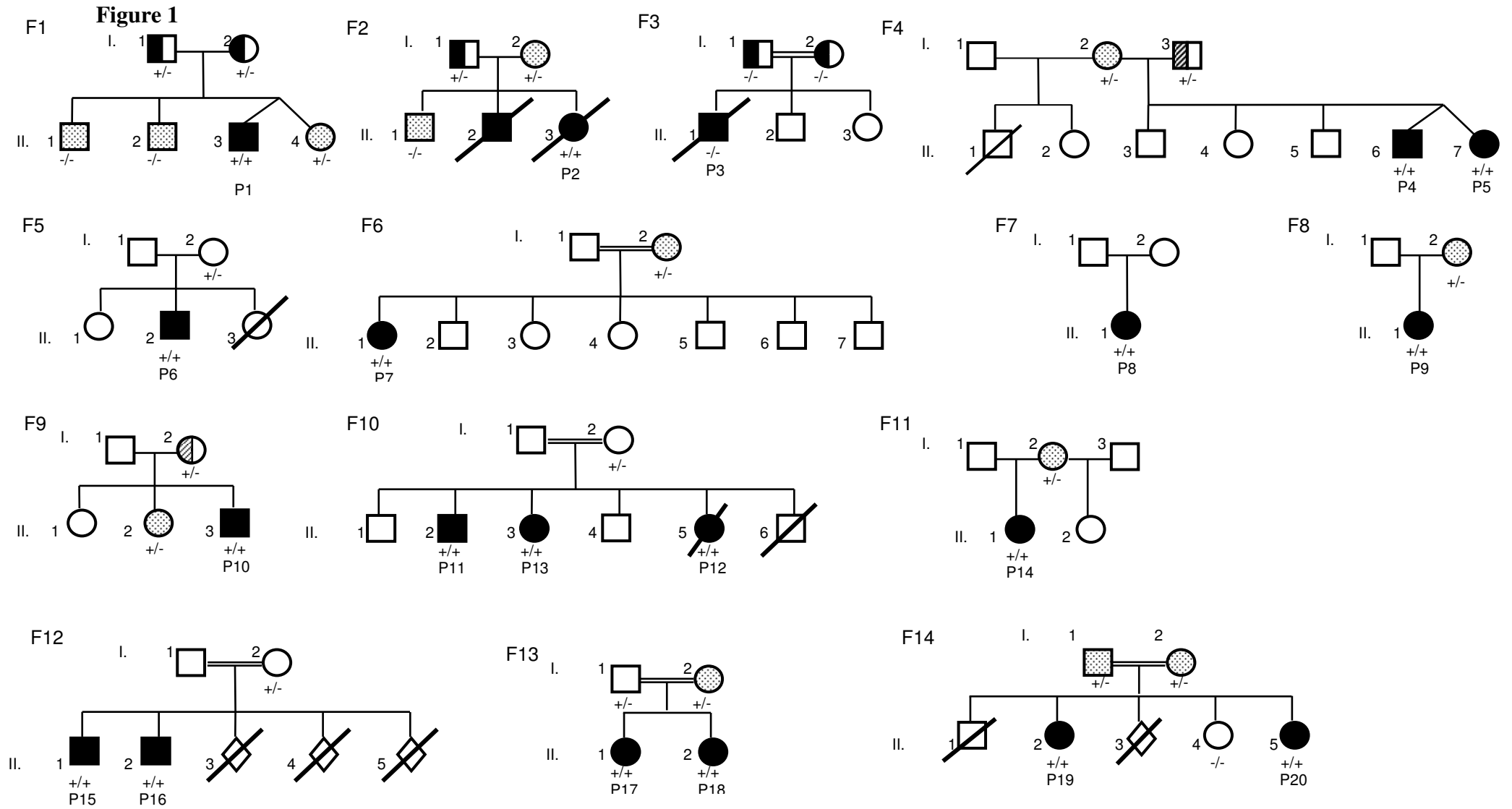
a: (+) denotes consanguinity present; (-) denotes consanguinity absent.

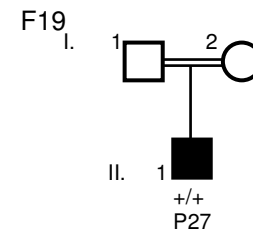
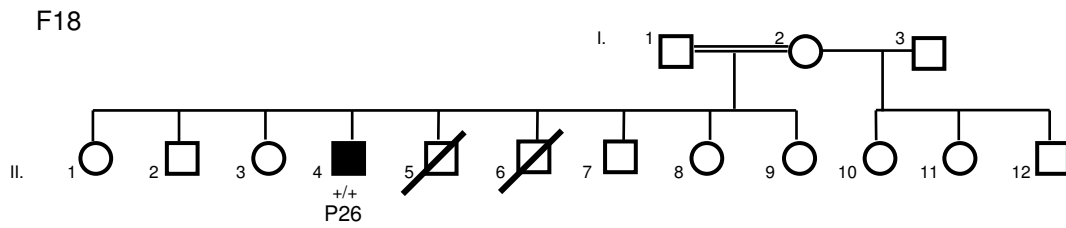
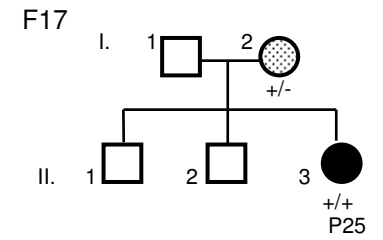
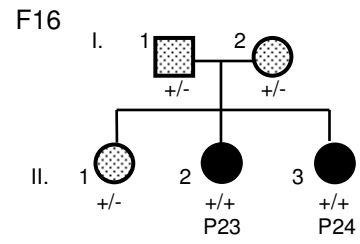
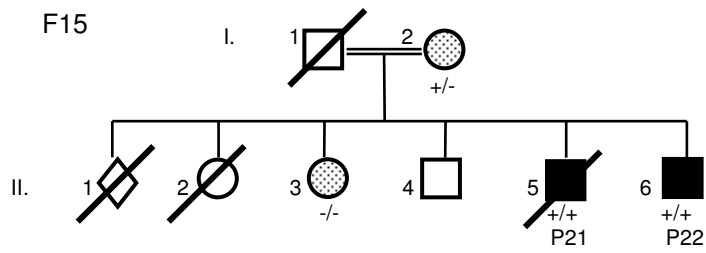
b: (+) denotes complication present but the age at onset is unknown; (-) denotes complication absent; NT: not tested.

Table 2: Mutations in the *WFS1* gene

Patients	Exon	Nucleotide change	Amino Acid change	Type of mutation
P1	8	c.[1355_1370dup16]+[1230_1233delCTCT]	p.[Ala460HisfsX88]+[Val412SerfsX29]	Frameshift; Frameshift
P2	8	c.[1941C>A]+[1949_1950delAT]	p.[Cys647X] + [Tyr650CysfsX61]	Nonsense; Frameshift
P4/P5	8	c.[1243_1245delGTC]+[1234_1237delIGTCT]	p.[Val415del]+[Val412SerfsX29]	Deletion; Frameshift
P6	8	c.[1230_1233delCTCT]+[1230_1233delCTCT]	p.[Val412SerfsX29]+[Val412SerfsX29]	Frameshift; Frameshift
P7	8	c.[1243_1245delGTC]+[1243_1245delGTC]	p.[Val415del]+[Val415del]	Deletion; Deletion
P8	8	c.[1145T>C]+[1230_1233delCTCT]	p.[Leu382Pro]+[Val412SerfsX29]	Missense; Frameshift
P9	8	c.[1949_1950delAT]+[1060_1062delCTT]	p.[Tyr650CysfsX61]+[Phe354del]	Deletion; Deletion
P10	8	c.[1243_1245delGTC]+[1230_1233delCTCT]	p.[V415del]+[Val412SerfsX29]	Frameshift Deletion;
P11/P12/P13	8	c.[1243_1245delGTC]+[1243_1245delGTC]	p.[Val415del]+[Val415del]	Deletion; Deletion
P14	8	c.[1230_1233delCTCT]+[1140_1163dup24]	p.[Val412SerfsX29]+[Asn714_Asn721dup]	Frameshift; Insertion
P15/P16	8	c.[1949_1950delAT]+[1949_1950delAT]	p.[Tyr650CysfsX61]+[Tyr650CysfsX61]	Frameshift; Frameshift
P17/P18	8	c.[876dupC]+[876dupC]	p.[Leu293ProfsX13]+[Leu293ProfsX13]	Frameshift; Frameshift
P19/P20	8	c.[1991T>C]+[1991T>C]	p.[Leu664Arg]+[Leu664Arg]	Missense; Missense
P21/P22	8	c.[2007T>G]+[2007T>G]	p.[Tyr669X]+[Tyr669X]	Nonsense; Nonsense
P23/P24	8	c.[1230_1233delCTCT]+[2643_2646delCTTT]	p.[Val412SerfsX29]+[Phe882SerfsX69]	Frameshift; Frameshift
P25	8	c.[1230_1233delCTCT]+[2105G>A]	p.[Val412SerfsX29]+[Gly702Asp]	Frameshift; Missense
P26	5	c.[472G>A]+[472G>A]	p.[Glu158Lys]+[Glu158Lys]	Missense; Missense
P27	8	c.[1230_1233delCTCT]+[1230_1233delCTCT]	p.[Val412SerfsX29]+[Val412SerfsX29]	Frameshift; Frameshift

Novel mutations are in bold.





CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo descrevemos uma das maiores casuísticas envolvendo portadores da SW, onde incluímos 27 pacientes (19 famílias). As duas maiores casuísticas foram reportadas por Kinsley e col. (68 pacientes / 44 famílias) e Barret col. (45 pacientes / 29 famílias), com pacientes do Reino Unido e Estados Unidos, respectivamente. Kinsley e col. avaliaram os prontuários de pacientes afetados para determinar as causas de morbidade e mortalidade desses indivíduos. Já, Barret e col. realizaram avaliação clínica e laboratorial nos pacientes recrutados. Entre os estudos envolvendo a análise molecular do gene *WFS1*, apenas Hardy e col., do Reino Unido, avaliaram um número maior de pacientes do que a nossa casuística, com 30 pacientes estudados provenientes de 19 famílias.

Por ser uma síndrome rara, realizamos um estudo envolvendo pacientes procedentes de diferentes regiões do país. Portanto uma das limitações do estudo é que alguns pacientes foram acompanhados em seus respectivos centros, dificultando a homogeneidade desejada em relação aos exames complementares e testes diagnósticos realizados.

Nossos dados mostram que, similar ao verificado em estudos anteriores, o gene *WFS1* é o principal gene envolvido na SW em nossa população, no qual identificamos mutações em 18 das 19 famílias estudadas. Em apenas uma família não localizamos mutação causadora da doença. Uma investigação futura indicará se se trata ou não de um caso de SW2.

Das quinze mutações identificadas nove são novas, aumentando assim, o espectro de mutações no gene *WFS1*. Todas as mutações encontradas estão localizadas no exon 8, com exceção da mutação *missense* c.472G>A (p.Glu158Lys) localizada no exon 5. Essa mutação foi associada a um fenótipo mais brando, com início tardio do diabetes e bom controle glicêmico com o uso de hipoglicemiante oral. Nas demais 17 famílias com mutação no exon 8 não verificamos correlação fenótipo-genótipo.

Identificamos a mutação c. 1230_1233delCTCT (Val412SerfsX29) localizada no exon 8 como a mais freqüente em nossa população, sugerindo uma investigação inicial dessa região em portadores da SW em nosso meio.

A síndrome de Wolfram, embora seja rara, é devastadora para os pacientes e seus familiares, pela quantidade de deficiências que ela proporciona. Para tanto, o seu diagnóstico etiológico propicia um melhor acompanhamento dos portadores da síndrome com investigação de todas as possíveis comorbidades a ela relacionadas. Apesar de não haver a tão almejada cura, o seu entendimento nos direciona a um aconselhamento genético das famílias e a uma orientação aos pacientes para melhorar a sua qualidade de vida: uso de desmopressina para tratamento do DI; prótese auditiva nos portadores de disacusia; orientações sobre controle de diabetes e sondagem urinária; e por fim, o estímulo para sua inclusão na sociedade e para quebra de preconceitos quanto às deficiências.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- O gene *WFS1* é o principal causador da síndrome de Wolfram em nosso meio.
- Com a identificação de nove novas mutações, aumentamos o espectro de mutações no gene *WFS1*.
- A maioria das mutações está concentrada no exon 8.
- A mutação c. 1230_1233delCTCT (Val412SerfsX29) foi a mais frequente, sugerindo que o rastreamento do gene *WFS1* em nossa população deva começar por essa região.
- Não identificamos uma correlação fenótipo-genótipo no exon 8, entretanto um fenótipo mais brando foi associado a uma mutação *missense* em homozigose no exon 5.

Tabela1: Primers utilizados no sequenciamento do gene *WFS1*

	Sense primer	Antisense primer
1	5'-CGG AGA TGT GGA GTG ATT GG-3'	3'-GAA ACT GAG GCC CGA AGA G
2	5'-GGA TGT GCC TGA CCT TGA CTT-3'	3'-ATG TTC AGG GAT AGC TGG GTG-5'
3	5'-CCC TCC ATC CTG ACA AGT GAC-3'	3'-CAC AGC CCA CAG AGA AGT GTC-5'
4	5'-AAT CTG GAG GCT GAC TGG TGT-3'	3'-AAC CTA ACG CTG GTG ATG CTG-5'
5	5'-AGA GTT GGC AGG GTC AGA GTG-3'	3'-CAC AGG AGC CAG GAC CTT CC-5'
6	5'-GGG CAC GAG GAG ATA GTC AAC-3'	3'-CCT ATC TCA CCC GTG CCT CC-5'
7	5'-AGC CCA TTG CTC TGT GTG AGG-3'	3'-AGA GTG TCT TAC AGC CGT GCC-5'
8.1	5'-TTC CCA CGT ACC ATC TTT CC-3'	3'-CAC ATC CAG GTT GGG CTC-5'
8.2	5'-AGA ACT TCC GCA CCC TCA C-3'	3'-TCA GGT AGG GCC AAT TCA AG-5'
8.3	5'-CTA TCG CTG CTG CCC TCC-3'	3'-GGG CAA AGA GGA AGA GGA AG-5'
8.4	5'-GTG AGC TCT CCG TGG TCA TC-3'	3'-CTC TGA GCG GTA CAC ATA G-5'
8.5	5'-GGT CAA GCT CAT CCT GGT GT-3'	3'-GTA GAG GCA GCG CAT CCA G-5'
8.6	5'-GCG TGA CTG ACA TCG ACA AC-3'	3'-GCT GAA CTC GAT GAG GCT G-5'
8.7	5'-CAG CAG CGA GTT CAA GAG C-3'	3'-ATC TAC ACA TGG TCG CAA GG-5'

FIGURA 1 A:

Dados clínicos, heredograma e análise molecular das famílias estudadas.

■ Síndrome de Wolfram; ■ Diabetes Mellitus; ▣ Tolerância à glicose diminuída; □ Tolerância à glicose não avaliada; ▤ Tolerância à glicose normal; NA: Não avaliado; (+): Mutação identificada; (-): Mutação não identificada; A e B: alelos paternos; C e D: Alelos maternos; DM: Diabetes Mellitus; DI: Diabetes Insipidus; AO: Atrofia óptica; DA: Déficit auditivo; US: Ultrassonografia; RNM: Ressonância nuclear magnética; TC: Tomografia computadorizada; TOTG: Teste oral de tolerância à glicose; IECA: Inibidor da enzima conversora de angiotensina.

Família 1

P1: sexo masculino, 27 anos.

Procedência: São Paulo – SP.

Diagnósticos:

- DM: 3 anos, tratamento com insulina.
- AO: 12 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: 3 anos, tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 12 anos, prótese auditiva desde 22 anos.
- Bexiga neurogênica desde 17 anos; infecção urinária de repetição; auto-cateterismo vesical intermitente.
- Disfunção erétil desde 20 anos; prótese peniana com 23 anos.
- Hipogonadismo hipergonadotrófico, em reposição hormonal.
- Polineuropatia periférica aos 20 anos; marcha atáxica; risos involuntários aos 25 anos.
- Episódios de mania e alucinações.

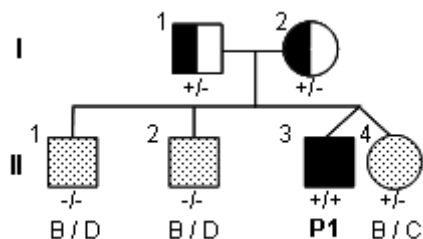
Exames Complementares:

- US vias urinárias: moderada dilatação cálico-pieloureteral bilateral. Bexiga com capacidade aumentada, com resíduo urinário moderado pós-esvaziamento.
- US testículos: testículos reduzidos.

- Polissonografia: síndrome apnéia-hipopnéia do sono obstrutiva de grau leve, associada à moderada dessaturação da oxi-hemoglobina; ronco acentuado.
- RNM encéfalo: neurohipófise não identificada. Microcrania. Atrofia Cortical.
- Albuminúria noturna /12 horas: 14,2 µ/min.

Antecedentes Familiares:

- Pais não consangüíneos.
- Pai: procedente de Pouso Alegre – MG.
DM há 3 anos; tratamento com dieta.
Hipertensão arterial sistêmica; hipercolesterolemia.
- Mãe: procedente de Corintos – MG.
DM desde 40 anos, tratamento inicial com medicamento oral e atualmente com insulina.
Hipertensão arterial sistêmica; hipercolesterolemia.
- Irmãos: II.1, II.2 e II.4 com tolerância normal à glicose. II.2: Tratamento prévio para depressão.

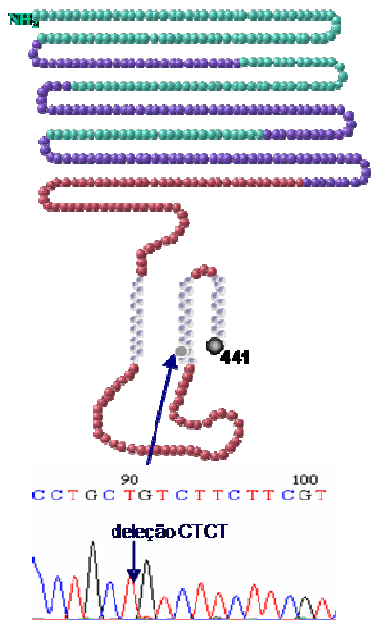


Alelos – Pai	A	B
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)
c.1726G>A (p.Gly576Ser)	- (GGC)	- (GGC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	+ (AAA)

Alelos – Mãe	C	D
c.1355_1370dup16 (p. Ala460HisfsX88)	+	-
c.684G>C (p.=)	- (CGG)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	- (GTT)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	- (AAT)	- (AAT)
c.1726G>A (p.Gly576Ser)	+ (AGC)	- (GGC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	+ (CAC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)

P1	A	C
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.1355_1370dup16 (p. Ala460HisfsX88)	-	+
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)
c.1726G>A (p.Gly576Ser)	- (GGC)	+ (AGC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	+ (AAA)

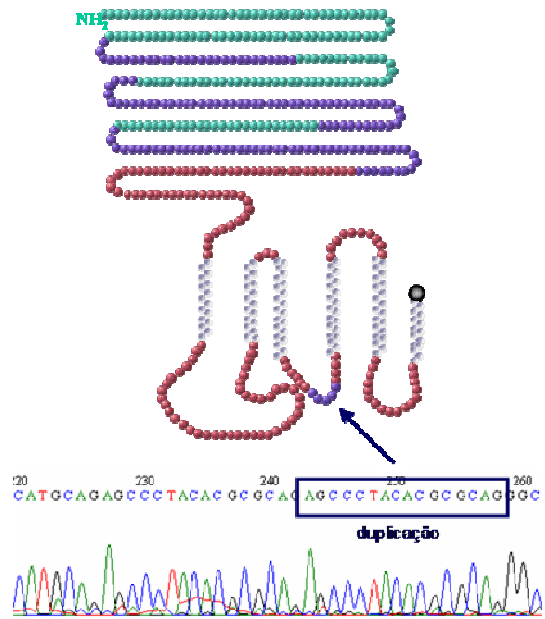
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)



```

20  L E P Y A H F L L          41
61  TGGAGCCCTATGCCCATTTCCTCT CTCT GTCCT 122
    |||
1575 TGGAGCCCTATGCCCATTTCCTCT CTCT GTCCT 1496
402  L E P Y A H F L L S V F 443
    
```

c.1355_1370dup16 (p. Ala460HisfsX88)



```

8  Y I S L S T H A E P Y T R R
CAGCTACCTGAGCCCTGAGCACCCCATGACAGGCCCTACACGGCCAGAGCCCTACACSCGCAGGGCCCT
|||||
1355 CAGCTACCTGAGCCCTGAGCACCCCATGACAGGCCCTACACGGCCAGAGCCCTACACSCGCAGGGCCCT
402  Y I S L S T H A E P Y T R R          A L
    
```


Família 2

P2: sexo feminino, óbito aos 27 anos.

Procedência: São Paulo – SP.

Diagnósticos:

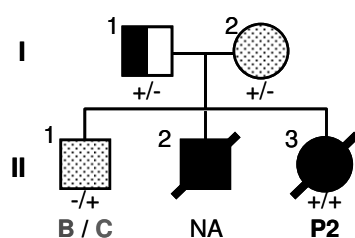
- DM: 3 anos, tratamento com insulina.
- AO: 8 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: 12 anos, tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 8 anos, prótese auditiva desde 14 anos.
- Bexiga neurogênica desde 24 anos; infecção urinária de repetição; auto-cateterismo vesical intermitente.
- Menarca 17 anos; espaniomenorréia.
- Hipotireoidismo desde 12 anos.
- Crises convulsivas recorrentes desde 12 anos. Tratamento com fenobarbital por 1 ano.
- Retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, dificuldade no aprendizado.
- Óbito: Paciente internou devido à crise convulsiva secundária à hipoglicemia. Há 2 meses vinha com quadro neurológico progressivo, com dificuldade para deambulação, dependente de ajuda de terceiros. Durante internação apresentou infecção do trato urinário, distúrbio hidroeletrólítico, parada cardiorespiratória e óbito.

Exames Complementares:

- US vias urinárias e urografia excretora: moderada dilatação cálico-pieloureteral bilateral.
- TC crânio: atrofia cortical moderada.
- Albuminúria 24 horas: 0,3 g/24h.
- Biópsia muscular (deltóide): atrofia tipo I.

Antecedentes Familiares:

- Pais não consangüíneos.
- Pai: procedente de São Paulo – SP
DM aos 40 anos, tratamento com hipoglicemiante oral; glaucoma.
- Mãe: procedente de Manaus – AM.
TOTG normal; hipertensão arterial sistêmica; gastrite.
- Irmãos: II.1: TOTG normal
II.2: óbito aos 21 anos. DM aos 3 anos; DI aos 12 anos;
diminuição da acuidade visual aos 15 anos; sem queixa auditiva;
retenção urinária aos 21 anos quando iniciou cateterismo
vesical. Apresentou infecção no trato urinário evoluindo para
sepse e óbito.
- Avó paterna com DM.

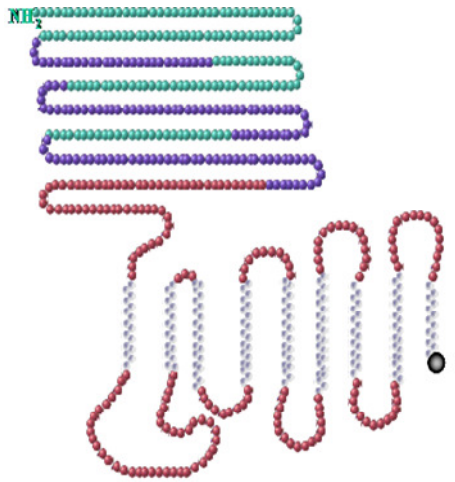


Alelos – Pai	A	B
c.1941C>A (p.Cys647X)	+	-
c.1949_1950delAT (p. Tyr650CysfsX61)	-	-
c.684G>C (p.=)	- (CGG)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	- (GTT)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	- (AAT)	- (AAT)
c.1832G>A (p.Arg611His)	+ (CAC)	- (CGC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	+ (AAA)

Alelos – Mãe	C	D
c.1941C>A (p.Cys647X)	-	-
c.1949_1950delAT (p. Tyr650CysfsX61)	+	-
c.684G>C (p.=)	+(CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (ATC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTT)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAT)	- (AAT)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	- (AAG)

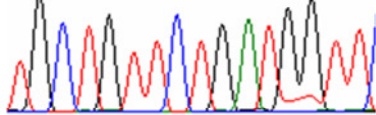
P2	A	C
c.1941C>A (p.Cys647X)	-	+
c.1949_1950delAT (p. Tyr650CysfsX61)	+	-
c.684G>C (p.=)	- (CGG)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	- (GTT)	+ (GTC)
c.1500T>C (p.=)	- (AAT)	+ (AAC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	+ (CAC)	- (CGC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	- (AAG)

c.1941C>A (p.Cys647X)



T G C T G T T C T G A T G G T T C

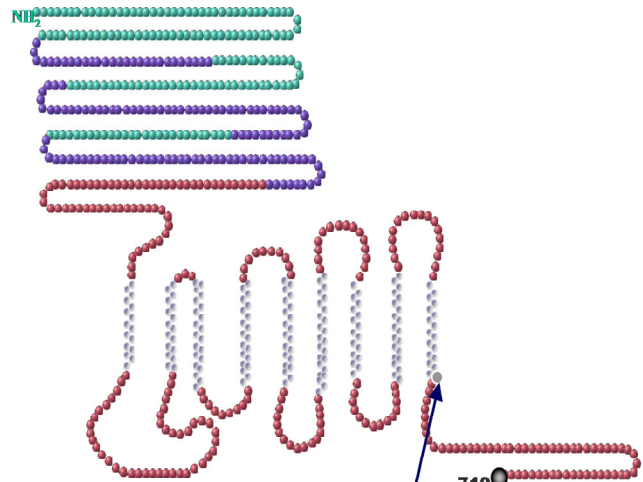
stop codon



```

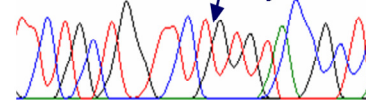
81   T A I V L F * W F Y V
241  CACGGCCATCGTGTCTGTTCTGATGGTCTATGTG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2090 CACGGCCATCGTGTCTGTTCTGCTGGTCTATGTG
641  T A I V L F C W F Y V
    
```

c.1949_1950delAT (p.Tyr650CysfsX61)



I T C T G C T G G I T C T G T G T A C C G C T

Deleção AT



```

A I V L F S W F
GCCATCGTGTCTGTTCTGCTGGTCT--GTGT 60
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
GCCATCGTGTCTGTTCTGCTGGTCTATGTGT 2124
A I V L F C W F Y V 651
    
```

Família 3

P3: sexo masculino, óbito aos 31 anos.

Procedência: São Paulo – SP.

Diagnósticos:

- DM: 14 anos, diagnóstico após corticoterapia para tratamento da atrofia óptica. Tratamento do DM com insulina.
- AO: 14 anos. Retinopatia diabética incipiente aos 23 anos.
- DI: Teste de restrição hídrica normal.
- DA: audiometria com discreta perda auditiva em altas frequências bilateralmente, sem prótese auditiva.
- Trato urinário: assintomático, sem necessidade de cateterismo. Proteinúria negativa aos 23 anos. Aos 29 anos teve diagnóstico de insuficiência renal crônica, quando iniciou hemodiálise. Aos 31 anos apresentou infecção no cateter de diálise evoluindo para óbito.

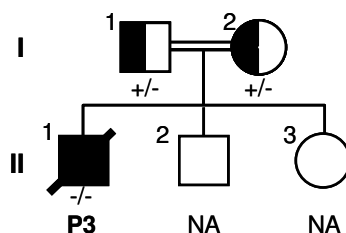
Exames Complementares:

- Urografia excretora aos 23 anos: ectasia cálico-pieloureteral direita.
- Uretrocistografia miccional aos 23 anos: pequeno resíduo pós-miccional.
- RNM encéfalo: Atrofia cortical difusa com redução do trato óptico; sela túrcica parcialmente vazia.
- Biópsia de músculo deltóide normal.
- Eletroneuromiografia e eletroencefalograma normais.

Antecedentes Familiares:

- Pais primos em primeiro grau, procedentes de Cresópolis – BA.
- Pai:
Diabetes mellitus desde 54 anos, tratamento inicial com hipoglicemiante oral e posterior com insulina; hipertensão arterial sistêmica; hipercolesterolemia; obesidade.
Mãe e três irmãos com DM. Dentre eles um está em hemodiálise. Um irmão com doença psiquiátrica (alucinações auditivas e visuais).

- Mãe:
DM desde 54 anos, tratamento com medicamento oral; hipertensão arterial sistêmica; obesidade; antecedente de úlcera gástrica.
Irmã com DM.
- Irmãos: II.2, II.3 não avaliados. Clinicamente assintomáticos.



- Pesquisa de mutação DNA mitocondrial (A3243G): resultado negativo.
- Sequenciamento dos exons 1 ao 8 do gene *WFS1*: identificado 5 polimorfismos.

Alelos – Pai	A	B
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)
c.1726G>A (p.Gly576Ser)	- (GGC)	+ (AGC)

Alelos – Mãe	C	D
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1224C>G (p.Lys432Val)	- (CTG)	+ (GTG)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)

P3	A	C
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1224C>G (p.Lys432Val)	- (CTG)	- (CTG)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)
c.1726G>A (p.Gly576Ser)	+ (AGC)	- (GGC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	- (CGC)

Família 4

P4: sexo masculino, 25 anos.

Procedência: São Paulo – SP.

Diagnósticos:

- DM: 3 anos e 6 meses, tratamento com insulina.
- AO: 10anos. Sem retinopatia diabética.
- DI: assintomático, volume urinário normal, densidade urinária normal.
- DA: 14 anos, prótese auditiva desde 20 anos.
- Trato urinário: assintomático até 25 anos. Em agosto de 2007 passou a apresentar episódios de incontinência urinária noturna e 1 episódio de infecção urinária.
- Fez uso de ácido valpróico e fenobarbital para tratamento de crises convulsivas aos 12 anos (convulsão com e sem crise hipoglicêmica). Eletroencefalograma normal. Atualmente assintomático sem medicação.
- Asma brônquica desde infância, com crises freqüentes de broncoespasmo.
- Desenvolvimento puberal normal.

Exames Complementares:

- US vias urinárias 22/11/2004: normal
- US vias urinárias 01/09/2006: espessamento difuso irregular das paredes da bexiga, pequeno resíduo pós-miccional (14 cm³).
- RNM encéfalo: normal
- Eletroneuromiografia e eletroencefalograma normais.
- Albuminúria 12h noturna: 3,1 µg/min.

P5: sexo feminino, 25 anos.

Procedência: São Paulo – SP.

Diagnósticos:

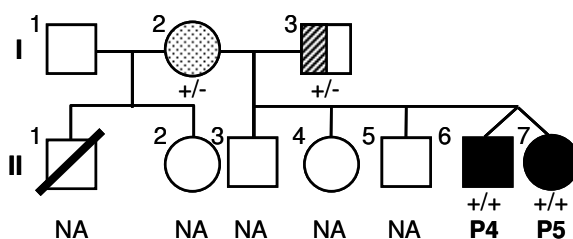
- DM: 3 anos e 6 meses, tratamento com insulina 6 meses após o diagnóstico.
- AO: 20 anos. Sem retinopatia diabética.
- DI: assintomático, volume urinário normal, densidade urinária normal.
- DA: 20 anos, prótese auditiva desde 20 anos.
- Trato urinário: assintomática.
- Hipercolesterolemia; hipertensão arterial sistêmica leve.
- Desenvolvimento puberal normal.

Exames Complementares:

- US vias urinárias 22/11/2004: normal
- US vias urinárias 01/09/2006: bexiga com paredes regulares; resíduo pós-miccional acentuado (313 cm³).
- Albuminúria 12h noturna, 2002: 33.9 mcg/min; 2007 em uso de IECA: 2,9 µg/min.

Antecedentes Familiares:

- Pais não consangüíneos.
- Pai: procedente de Ipiaú – BA.
TOTG 2006: normal; 2007: glicemia de jejum alterada; dislipidemia mista.
Primo com DM.
- Mãe: procedente de Coaraci – BA.
Tolerância à glicose normal.
Hipertensão arterial sistêmica; hipertrigliceridemia.
- Irmãos: II.1 a II.5 não avaliados.
II.1: óbito com 18 anos por insuficiência renal crônica.

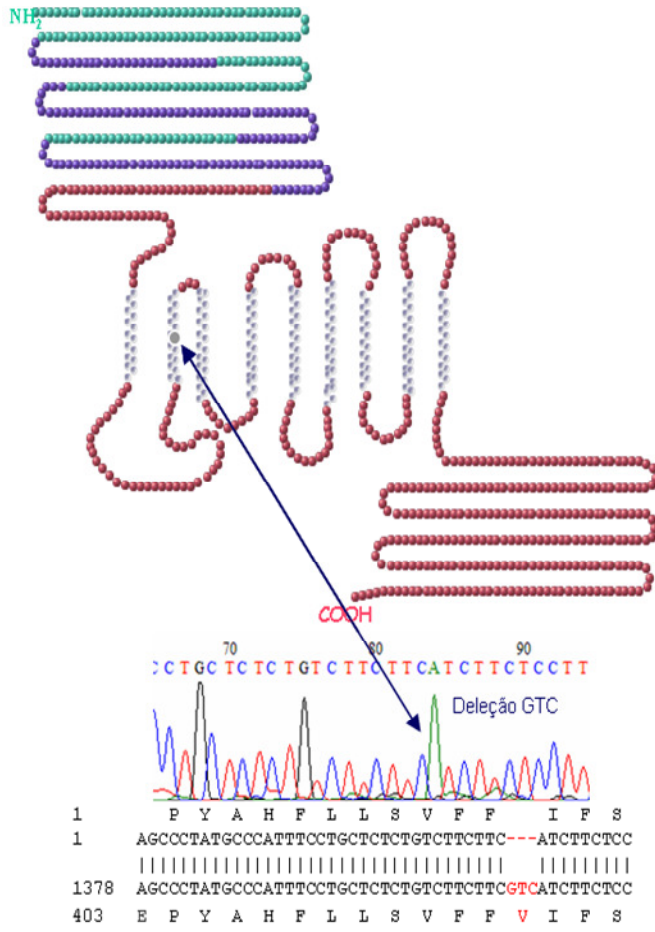


Alelos – Pai	A	B
c.1234_1237delGTCT (p.Val412SerfsX29)	-	-
c.1243_1245delGTC (p.Val415del)	+	-
c.684G>C (p.=)	- (CGG)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	- (GTT)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	- (AAT)	- (AAT)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)

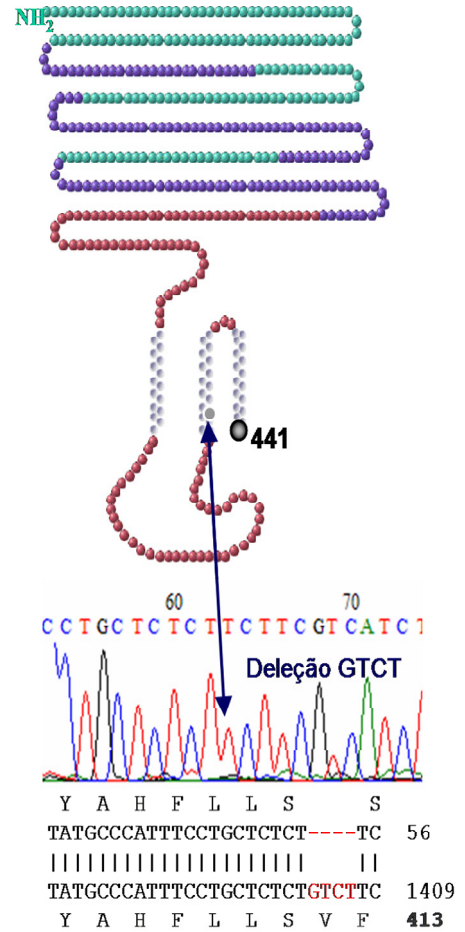
Alelos – Mãe	C	D
c.1234_1237delGTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.1243_1245delGTC (p.Val415del)	-	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	- (AAG)

P4 e P5	A	C
c.1234_1237delGTCT (p.Val412SerfsX29)	-	+
c.1243_1245delGTC (p.Val415del)	+	-
c.684G>C (p.=)	- (CGG)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	- (GTT)	+ (GTC)
c.1500T>C (p.=)	- (AAT)	+ (AAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	- (AAG)

c.1243_1245delGTC (p.Val415del)



c.1234_1237delGTCT (p.Val412SerfsX29)



Família 5

P6: sexo masculino, 22 anos.

Procedência: Goiânia – GO.

Diagnósticos:

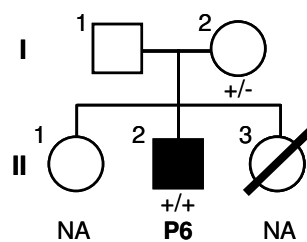
- DM: 9 anos, tratamento com insulina.
- AO: 14 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: 14 anos; DI central, parcial. Tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 14 anos, sem prótese auditiva. Perda auditiva mais acentuada à esquerda
- Atonia trato urinário: 14 anos, não realiza cateterismo.
- Neurológico: nistagmo.
- Desenvolvimento puberal normal.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: volumoso resíduo pós-miccional
- Urografia excretora: hidronefrose
- Estudo urodinâmico: esforço miccional, hipotonia do detrusor, presença de contrações involuntárias.
- Cintilografia renal normal
- TC hipófise: redução volumétrica de hipófise.
- Endoscopia digestiva alta: esofagite erosiva, atrofia da mucosa bulbo-duodenal.

Antecedentes Familiares:

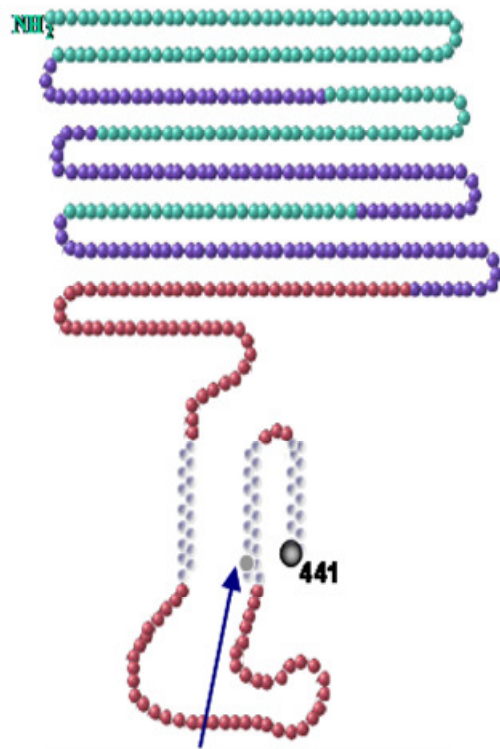
- Pais não consangüíneos, divorciados.
- Pai: sem contato; não avaliado.
- Mãe: procedente de Goiânia – GO.
- Irmãs: II.1, assintomática; II.3 óbito com 4 anos por cardiopatia.
- Tio materno com distúrbio psiquiátrico
- Avó materna, tia avó e primo de 2º grau com DM.



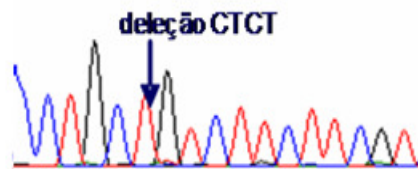
Alelos – Mãe	C	D
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)

P6	C	A
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	+
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)

c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29) homozigose



90 100
 CCTGC TGTCTTCTTCGT



```

20  L E P Y A H F L L
61  TGGAGCCCTATGCCCATTTCTGCT---GICTT
    |||
1375 TGGAGCCCTATGCCCATTTCTGCTCTCTGICTT
402  L E P Y A H F L L S V F
    
```

Família 6

P7: sexo feminino, 19 anos.

Procedência: Zona rural de Salinas – MG.

Diagnósticos:

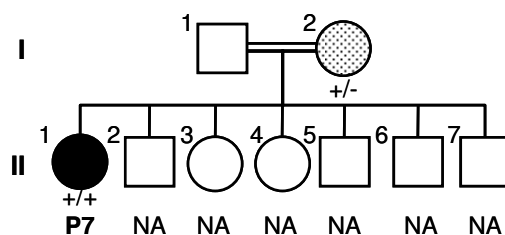
- DM: 6 anos, tratamento com insulina.
- AO: 15 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: 18 anos, tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 12 anos, prótese auditiva desde 18 anos.
- Bexiga neurogênica: 17 anos, auto-cateterismo intermitente, infecção urinária de repetição.
- Hipertensão arterial sistêmica leve.
- Desenvolvimento puberal normal.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: acentuada dilatação cálico-pieloureteral até terço distal bilateral. Bexiga com paredes regulares e conteúdo anecóico.
- RNM crânio normal.
- RNM sela túrcica: redução volumétrica do complexo quiasma e nervos ópticos. Hipersinal em T1 da neurohipófise, parcialmente caracterizado com áreas de hipossinal e menor impregnação do gadolínio na neurohipófise.

Antecedentes Familiares:

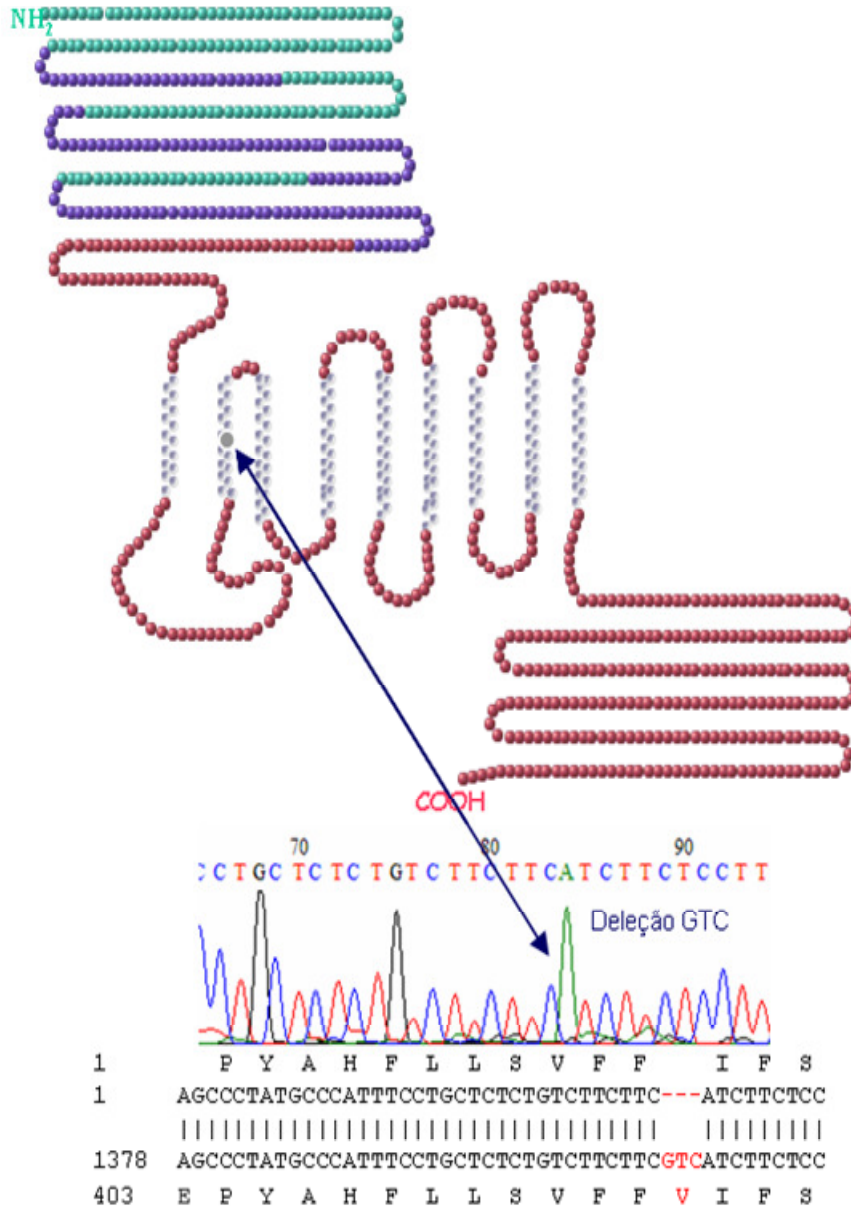
- Pais primos em segundo grau, procedentes da zona rural de Salinas – MG.
- Pai: assintomático, não avaliado.
- Mãe:
Tolerância à glicose normal.
- Irmãos: não avaliados.
II.7: lábio leporino e fenda palatina.
- Sem história familiar de DM.



Alelos – Mãe	C	D
c.1243_1245delGTC (p. Val415del)	+	-
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	- (CGC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	+ (TCG)

P7	C	A
c.1243_1245delGTC (p. Val415del)	+	+
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	+ (TCG)

c.1243_1245delGTC (p.Val415del) homozigose



Família 7

P8: sexo feminino, 14 anos.

Procedência: Reside em São Paulo. Paciente adotada, procedência desconhecida.

Diagnósticos:

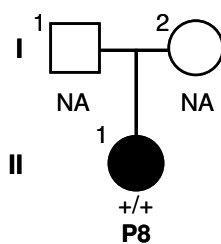
- DM: 6 anos, tratamento com insulina.
- AO: 11 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: 10 anos; DI central, parcial. Tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 14 anos, assintomática. Audiometria em 2007 com perda auditiva em altas frequências.
- Resíduo urinário (idade de diagnóstico não relatado). Não realiza cateterismo vesical.
- Neurológico: síndrome das pernas inquietas (síndrome de Ekbom); neuropatia periférica desde 8 anos.
- Depressão, recusa tratamento.
- Desenvolvimento puberal: pubarca 6 anos; telarca 11 anos; menarca -.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: discreta ectasia pielocalicial bilateral. Bexiga com capacidade aumentada, paredes espessadas, trabeculadas com divertículos. Moderado volume pós-miccional (120 ml).
- TC crânio normal.
- Polissonografia normal.
- Eletroneuromiografia normal.
- Albuminúria: negativa.

Antecedentes Familiares:

- Paciente adotada, história familiar desconhecida.



P8

c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)

+

-

c.1145T>C (p.Leu382Pro)

-

+

c.684G>C (p.=)

+ (CGC)

- (CGG)

c.997A>G (p.Ile333Val)

+ (GTC)

- (ATC)

c.1185T>C (p.=)

+ (GTC)

- (GTT)

c.1500T>C (p.=)

+ (AAC)

- (AAT)

c.2433G>A (p.=)

+ (AAA)

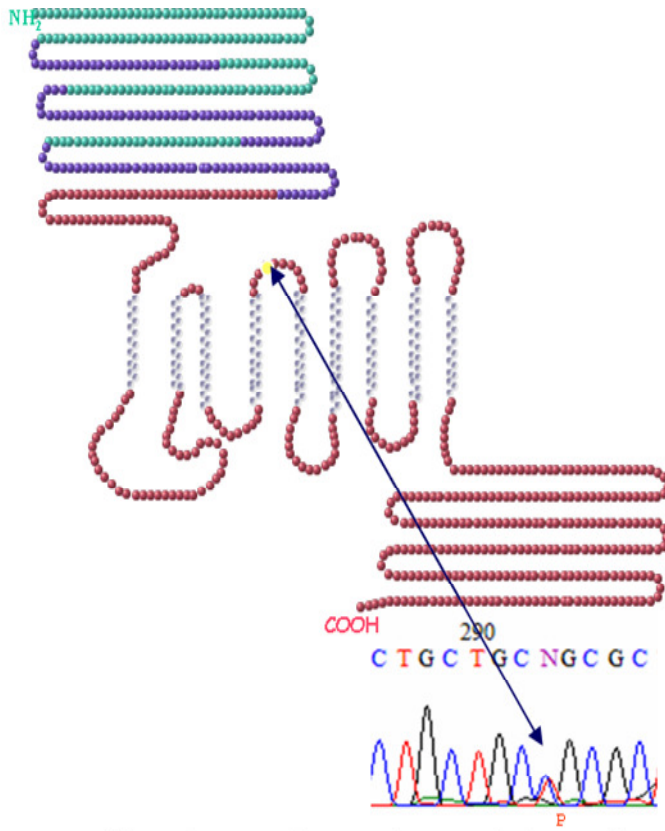
- (AAG)

c.2565A>G (p.=)

+ (TCG)

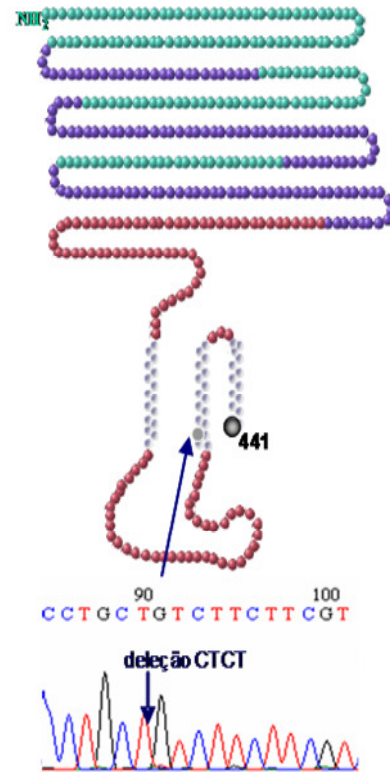
+ (TCA)

c.1145T>C (p.Leu382Pro)



242 gctgggagaaacttcgacccctaccgacctgctgcyggcgttcga
 |||
 1278 gctgggagaaacttcgacccctaccgacctgctgctggcgttcga
 370 A W E N F R T L T D L L L R F E

c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)



20 L E P Y A H F L L
 61 TGGAGCCCTATGCCCATTCCTGCT—GTCIT
 |||
 1375 TGGAGCCCTATGCCCATTCCTGCTCTGTCIT
 402 L E P Y A H F L L S V F

Família 8

P9: sexo feminino, 27anos.

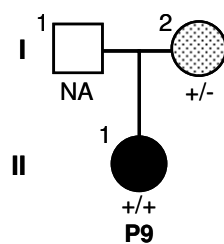
Procedência: Rio Grande – RS.

Diagnósticos:

- DM: 8 anos, tratamento com insulina.
- AO: 8 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: assintomática.
- DA: assintomática, audiometria não realizada.
- Incontinência urinária em investigação.

Antecedentes Familiares:

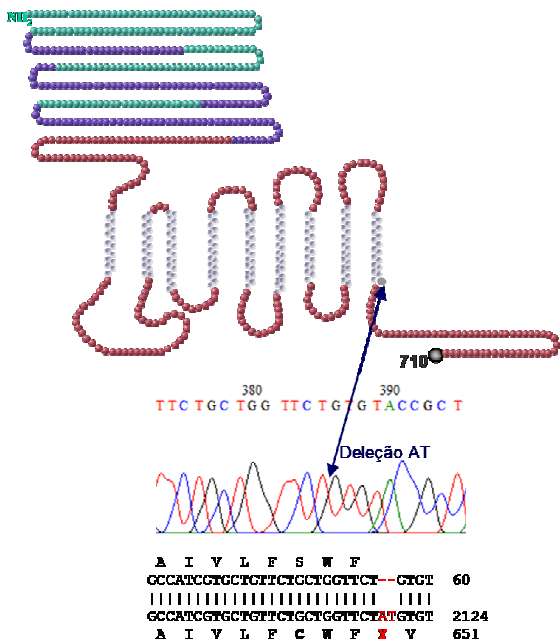
- Pais não consangüíneos.
- Pai: sem contato, não avaliado.
- Mãe: procedente de Rio Grande – RS.
Tolerância à glicose normal.



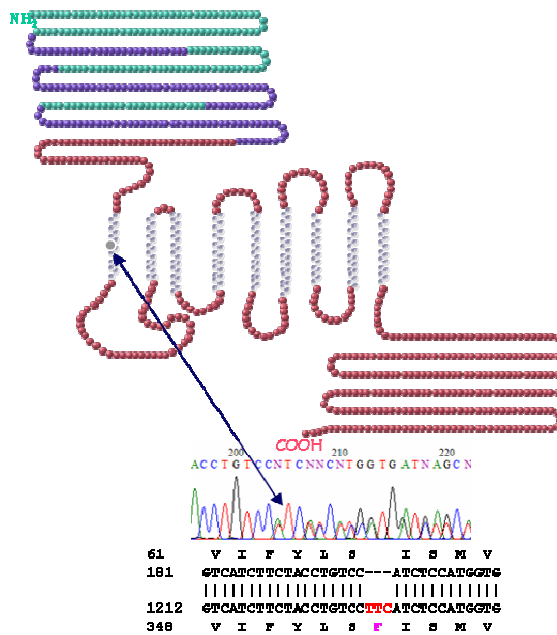
Alelos – Mãe	C	D
c.1060_1062delTTC (p.Phe354del)	-	-
c.1949_1950delAT (p. Tyr650CysfsX61)	+	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	- (CGC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	- (AAG)

P9	C	A
c.1060_1062delTTC (p.Phe354del)	-	+
c.1949_1950delAT (p. Tyr650CysfsX61)	+	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	+ (AAA)

c.1949_1950delAT (p.Tyr650CysfsX61)



c.1060_1062delTTC (p.Phe354del)



Família 9

P10: sexo masculino, 35 anos.

Procedência: Alto Paraná – PR.

Diagnósticos:

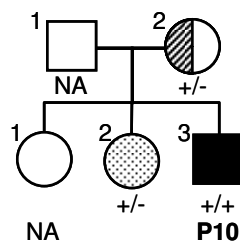
- DM: 8 anos, tratamento com insulina.
- AO: 16 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: 15 anos, tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 10 anos, em uso de prótese auditiva.
- Bexiga neurogênica: 23 anos, auto-cateterismo intermitente, infecção urinária de repetição
- Disfunção erétil, 23 anos.
- Diagnósticos psiquiátricos: oligofrenia, transtorno de ansiedade, depressão. Tratamento medicamentoso.
- Hipogonadismo hipergonadotrófico, em reposição hormonal.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: acentuada dilatação cálico-pieloureteral até terço distal bilateral. Bexiga com paredes regulares e conteúdo anecóico.
- RNM hipófise normal.
- Proteinúria 24h: 24 mg/24h.

Antecedentes Familiares:

- Pais não consangüíneos.
- Pai: sem contato desde a gestação de P10, não avaliado.
- Mãe:
Tolerância diminuída à glicose; obesidade; depressão.
- Irmãs: II.1: não avaliada.
II.2: TOTG normal.
- Sem história familiar de DM.

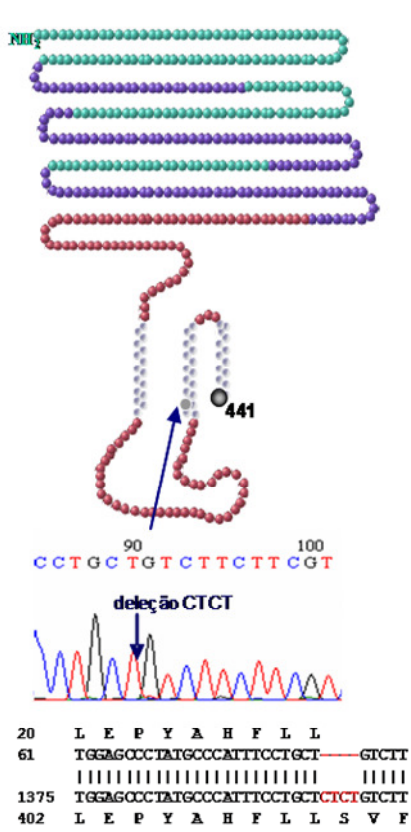


Irmã: II.2 (alelo mutado = pai)	D	A
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	-	+
c.1243_1245delGTC (p.Val415del)	-	-
c.684G>C (p.=)	- (CGG)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	- (GTT)	+ (GTC)
c.1367G>A (p.Arg456His)	- (CGC)	- (CGC)
c.1500T>C (p.=)	- (AAT)	+ (AAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	- (AAG)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	- (TCA)

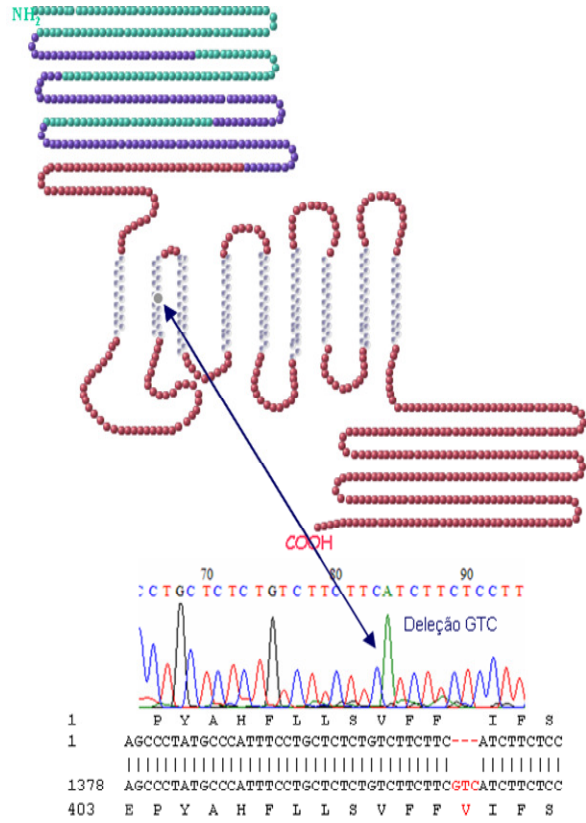
Alelos – Mãe	C	D
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	-	-
c.1243_1245delGTC (p.Val415del)	+	-
c.684G>C (p.=)	- (CGG)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	- (GTT)	- (GTT)
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	- (CGC)
c.1500T>C (p.=)	- (AAT)	- (AAT)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	+ (TCG)

P10	C	A
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	-	+
c.1243_1245delGTC (p.Val415del)	+	-
c.684G>C (p.=)	- (CGG)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	- (ATC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	- (GTT)	+ (GTC)
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	- (CGC)
c.1500T>C (p.=)	- (AAT)	+ (AAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	- (AAG)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	- (TCA)

c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)



c.1243_1245delGTC (p.Val415del)



Família 10

P11: sexo masculino, 27 anos.

Procedência: Zona rural de Goiânia – GO.

Diagnósticos:

- DM: 9 anos, tratamento com insulina.
- AO: 9 anos, sem retinopatia diabética. Catarata subcapsular posterior em ambos os olhos.
- DI: 24 anos, tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 19 anos, prótese auditiva desde 18 anos.
- Trato urinário: assintomático, não realiza cateterismo.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: rim direito com dilatação do grupo calicial superior; rim esquerdo com cisto renal simples.

P12: sexo feminino, 22 anos.

Procedência: Zona rural de Goiânia – GO.

Diagnósticos:

- DM: 7 anos, tratamento com insulina.
- AO: 12 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: tratamento com desmopressina nasal, idade do diagnóstico não informada.
- DA: surdez neurossensorial, idade não informada.
- Bexiga neurogênica: realiza auto-cateterismo intermitente

P13: sexo feminino, óbito aos 25 anos.

Procedência: Zona rural de Goiânia – GO.

Diagnósticos:

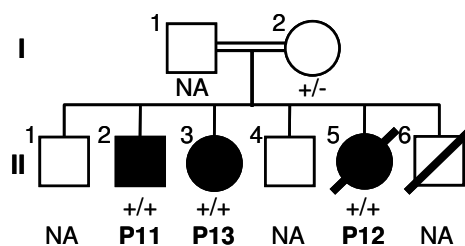
- DM: 5 anos, tratamento com insulina.
- AO: 11 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: 14 anos, tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 14 anos.
- Bexiga neurogênica: 16 anos, auto-cateterismo intermitente, infecção urinária de repetição.

Exames Complementares:

- Avaliação urológica: megaureter e hidronefrose rim esquerdo. Exclusão funcional à esquerda.

Antecedentes Familiares:

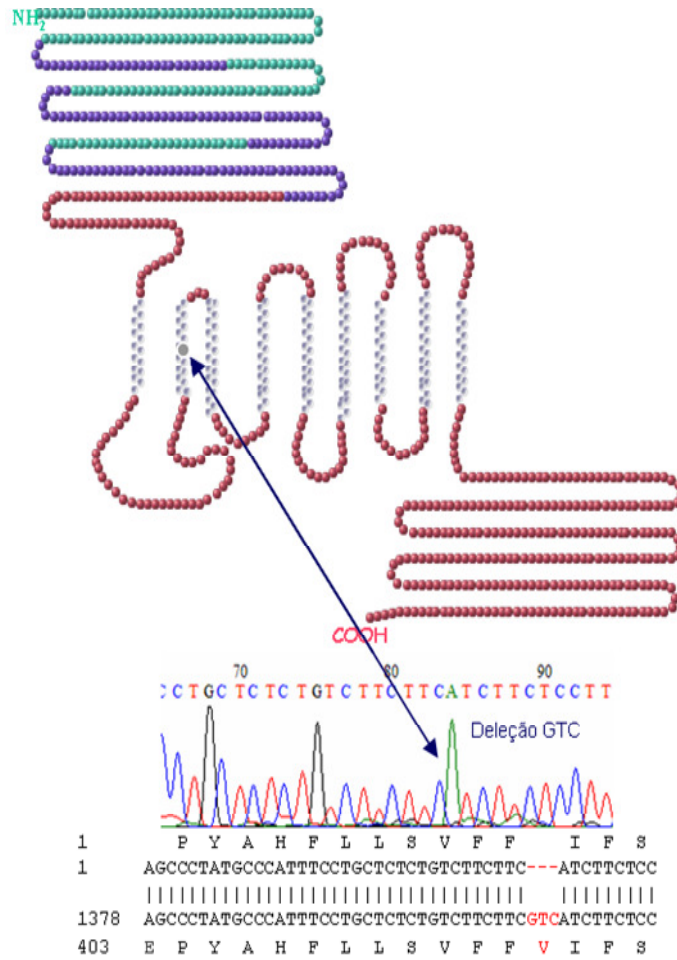
- Pais primos em primeiro grau, procedentes da zona rural de Goiânia – GO.
- Pai: sem contato, não avaliado.
- Mãe: assintomática
- Irmãos: II.1 e II.4 assintomáticos, não avaliados.
II.6: óbito com 1 ano, causa desconhecida.
- Tia paterna com DM.



Alelos – Mãe	C	D
c.1243_1245delGTC (p. Val415del)	+	-
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	- (CGC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	+ (TCG)

P11; P12 e P13	C	A
c.1243_1245delGTC (p. Val415del)	+	+
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	+ (TCG)

c.1243_1245delGTC (p.Val415del) homozigose



Família 11

P14: sexo feminino, 27 anos.

Procedência: São Paulo – SP.

Diagnósticos:

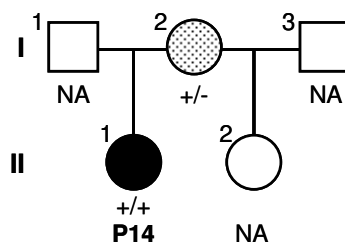
- DM: 7 anos, tratamento com insulina.
- AO: 20 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: diagnóstico com 20 anos, tratamento com desmopressina nasal.
- DA: diagnóstico aos 25 anos, com indicação de prótese auditiva.
Sintomas de diminuição auditiva desde 12 anos.
- Trato urinário: assintomática
- Desenvolvimento puberal normal.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: normal.

Antecedentes Familiares:

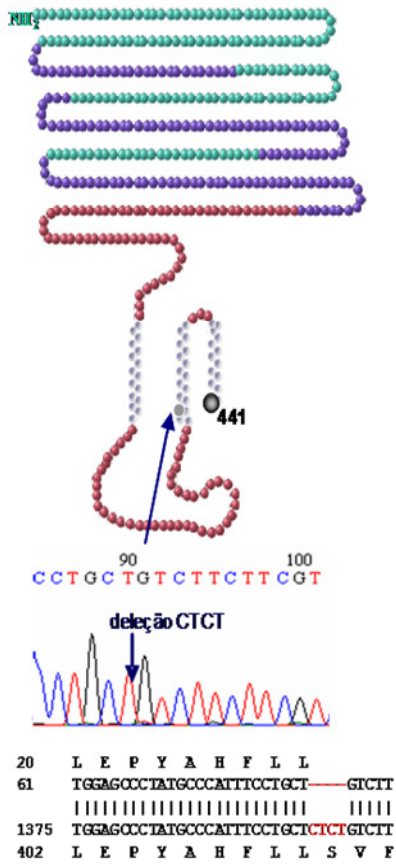
- Adotada pela tia materna. Pouco contato com mãe biológica.
- Pais não consangüíneos.
- Pai: desconhecido, não avaliado.
- Mãe: procedente de Londrina - PR
Tolerância à glicose normal; infarto agudo do miocárdio; insuficiência cardíaca congestiva.
- Irmã sem contato, não avaliada.



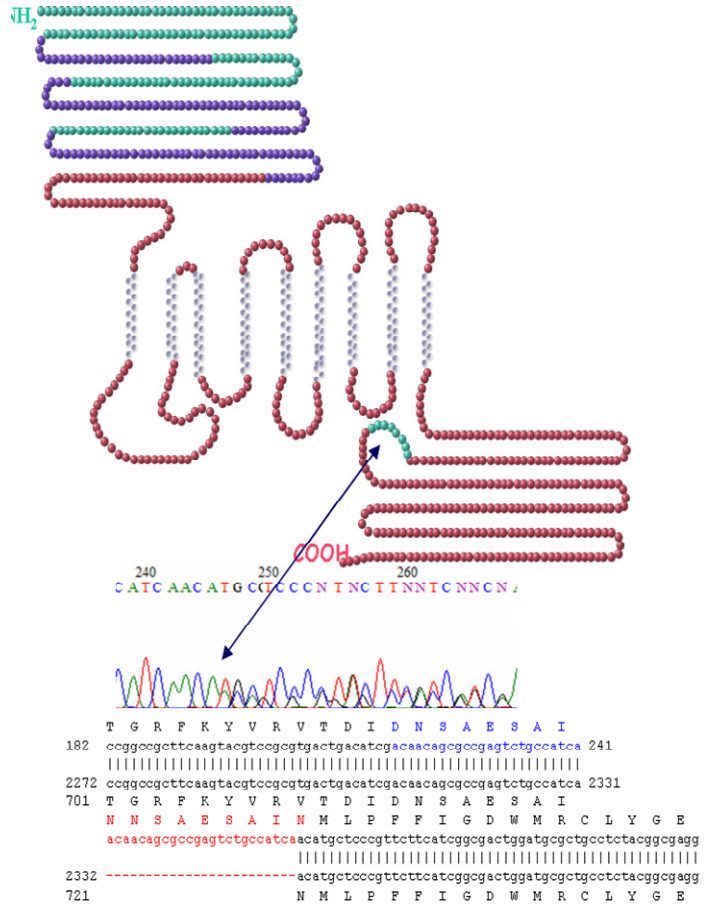
Alelos – Mãe	C	D
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.1140_1163dup24 (p.Asn714_Asn721dup)	-	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	- (CGC)

P14	C	A
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.1140_1163dup24 (p.Asn714_Asn721dup)	-	+
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)

c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)



c.1140_1163dup24 (p.Asn714_Asn721dup)



Família 12

P15: sexo masculino, 30 anos.

Procedência: Jundiaí - SP.

Diagnósticos:

- DM: 7 anos, tratamento com insulina.
- AO: 11 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: 17 anos, tratamento com desmopressina nasal.
- DA: 20 anos, sem prótese auditiva.
- Bexiga neurogênica: idade ao diagnóstico não informada, cateterismo intermitente esporadicamente.
- Desenvolvimento puberal normal.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: dilatação ureteral e hidronefrose bilateral.

P16: sexo masculino, 24 anos.

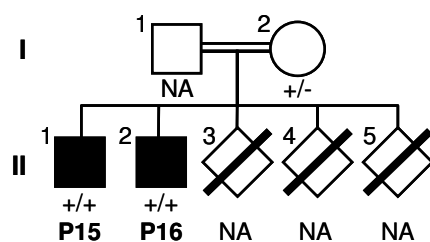
Procedência: Jundiaí - SP.

Diagnósticos:

- DM: 11 anos, tratamento com insulina.
- AO: 11 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: assintomático.
- DA: idade de diagnóstico da perda auditiva não informada.
- Bexiga neurogênica: idade ao diagnóstico não informada, auto-cateterismo intermitente.
- Desenvolvimento puberal normal.

Antecedentes Familiares:

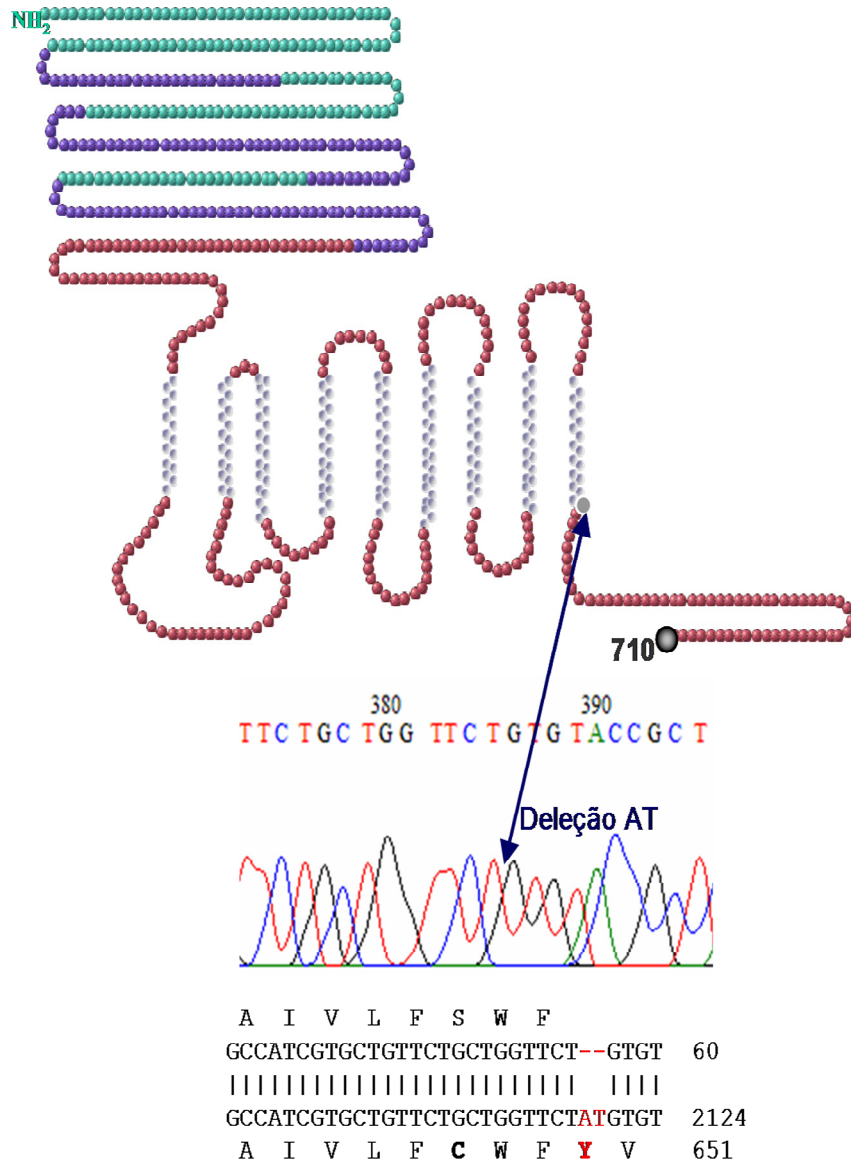
- Pais consangüíneos, procedentes de Jundiaí – SP.
- Pai: sem contato, não avaliado.
- Mãe: assintomática.
- Irmãos: II.3 a II.5 natimortos (cardiopatia congênita).



Alelos – Mãe	C	D
c.1949_1950delAT (p. Tyr650CysfsX61)	+	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
C.1500C>T (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)

P15 e P16	C	A
c.1949_1950delAT (p. Tyr650CysfsX61)	+	+
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
C.1500C>T (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)

c.1949_1950delAT (p.Tyr650CysfsX61) homozigose



Família 13

P17: sexo feminino, 21 anos.

Procedência: Caruaru - PE.

Diagnósticos:

- DM: 3 anos, tratamento com insulina.
- AO: 9 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: assintomática, densidade urinária normal.
- DA: 19 anos, sem prótese auditiva.
- Bexiga neurogênica: 14 anos, auto-cateterismo intermitente.
- Desenvolvimento puberal normal.
- Hipercolesterolemia
- Depressão, em tratamento medicamentoso.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: dilatação cálico-pieloureteral bilateral acentuada. Bexiga com repleção acentuada, paredes regulares. Acentuado volume urinário pós-miccional.
- RNM encéfalo: normal
- RNM sela túrcica: afinamento do quiasma, nervos e tratos ópticos.

P18: sexo feminino, 19 anos.

Procedência: Caruaru – PE.

Diagnósticos:

- DM: 3 anos, tratamento com insulina.
- AO: 10 anos, com retinopatia diabética não proliferativa.
- DI: assintomático.
- DA: 10 anos, em uso de prótese auditiva desde 17 anos; zumbido desde 8 anos.
- Bexiga neurogênica: 9 anos, auto-cateterismo intermitente.

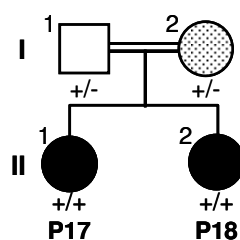
- Desenvolvimento puberal: menarca 14 anos, espaniomenorréia.
- Hipercolesterolemia.
- Depressão e anorexia. Tratamento medicamentoso.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: dilatação cálico-pieloureteral bilateral acentuada, com perda da diferenciação cortiço-medular. Bexiga com boa repleção, paredes regulares e conteúdo anecóico. Acentuado volume urinário pós-miccional.
- RNM encéfalo: normal
- RNM sela túrcica: afinamento do quiasma, nervos e tratos ópticos.

Antecedentes Familiares:

- Pais consangüíneos, procedentes de Caruaru – PE.
- Pai: assintomático.
- Mãe:
Tolerância à glicose normal; depressão.

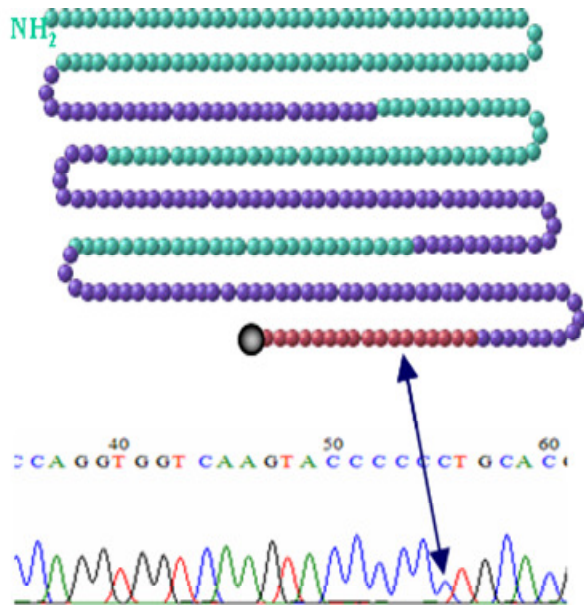


Pai	A	B
c.876dupC (p.Leu293ProfsX13)	+	-
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1805C>T (p.Ala602Val)	+ (GTG)	- (GCG)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	- (CGC)
c.2356G>A (p.Gly786Ser)	+ (AGC)	- (GGC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	- (AAG)

Alelos – Mãe	C	D
c.876dupC (p.Leu293ProfsX13)	+	-
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1805C>T (p.Ala602Val)	+ (GTG)	- (GCG)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2356G>A (p.Gly786Ser)	+ (AGC)	- (GGC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	+ (AAA)

P17 e P18	A	C
c.876dupC (p.Leu293ProfsX13)	+	+
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1805C>T (p.Ala602Val)	+ (GTG)	+ (GTG)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	- (CGC)
c.2356G>A (p.Gly786Ser)	+ (AGC)	+ (AGC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	- (AAG)

c.876dupC (p.Leu293ProfsX13) homozigose



```

1      V V K Y P P A R H H G D Q G V P D *
26    AGGTGGTCAAGTACCCCCCTGCACGCCATCATGGAGATCAAGGAGTACCTGATTGACATG 85
      |||
1030  AGGTGGTCAAGTACCCCC-TGCACGCCATCATGGAGATCAAGGAGTACCTGATTGACATG 1088
287   K V V K Y P L H A I M E I K E Y L I D M
    
```


Família 14

P19: sexo feminino, 25 anos.

Procedência: Macapá - AP.

Diagnósticos:

- DM: 2 anos, tratamento com insulina.
- AO: 15 anos. Retinopatia proliferativa bilateral com 23 anos, quando foi realizado panfotocoagulação. Após 6 meses evoluiu com glaucoma neovascular.
- DI: assintomática, densidade urinária normal.
- DA: 23 anos, sem prótese auditiva.
- Bexiga neurogênica: 20 anos, auto-cateterismo intermitente.
- Desenvolvimento puberal: menarca com 16,5 anos.
- Hipercolesterolemia

Exames Complementares:

- US vias urinárias, 2005: pequena dilatação pielocalicial bilateral. Bexiga com boa repleção paredes regulares.
- US vias urinárias, 2006: acentuada dilatação ureteral e moderada dilatação pielocalicial bilateral. Bexiga com boa repleção, paredes irregulares com espessura preservada.
- RNM encéfalo: normal
- RNM sela túrcica: hipersinal da neurohipófise de difícil caracterização.
- Proteinúria 24h: 5,12 g/24h. Creatinina normal.

P20: sexo feminino, 13 anos.

Procedência: Macapá – AP.

Diagnósticos:

- DM: 4 anos, tratamento com insulina.
- AO: 9 anos, sem retinopatia diabética.

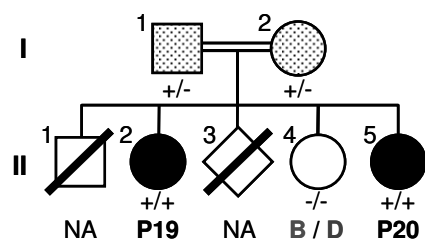
- DI: assintomática.
- DA: 11 anos, sem prótese auditiva.
- Trato urinário: incontinência urinária noturna desde 9 anos, sensação de resíduo urinário.
- Desenvolvimento puberal: telarca 10 anos, pubarca 11 anos.
- Hipercolesterolemia.

Exames Complementares:

- US vias urinárias, 2005: normal.
- US vias urinárias, 2006: mínima dilatação pielocalicial à direita.
- RNM encéfalo: normal
- RNM sela túrcica: afinamento do quiasma, nervos e tratos ópticos.
- Albuminúria de 24 horas: 4,28 µg/min.

Antecedentes Familiares:

- Pais primos em primeiro grau, procedentes de Macapá – AP.
- Pai: assintomático
Tolerância à glicose normal.
- Mãe: assintomática
Tolerância à glicose normal.
- Irmãos: II.1: óbito 40 dias de vida, por gastroenterocolite aguda.
II.3: óbito fetal com 6 meses de gestação.
II.4: assintomática.
- 4 primos maternos e avó materna com DM.
- 1 tio paterno com depressão; 1 tio paterno com perda da audição.



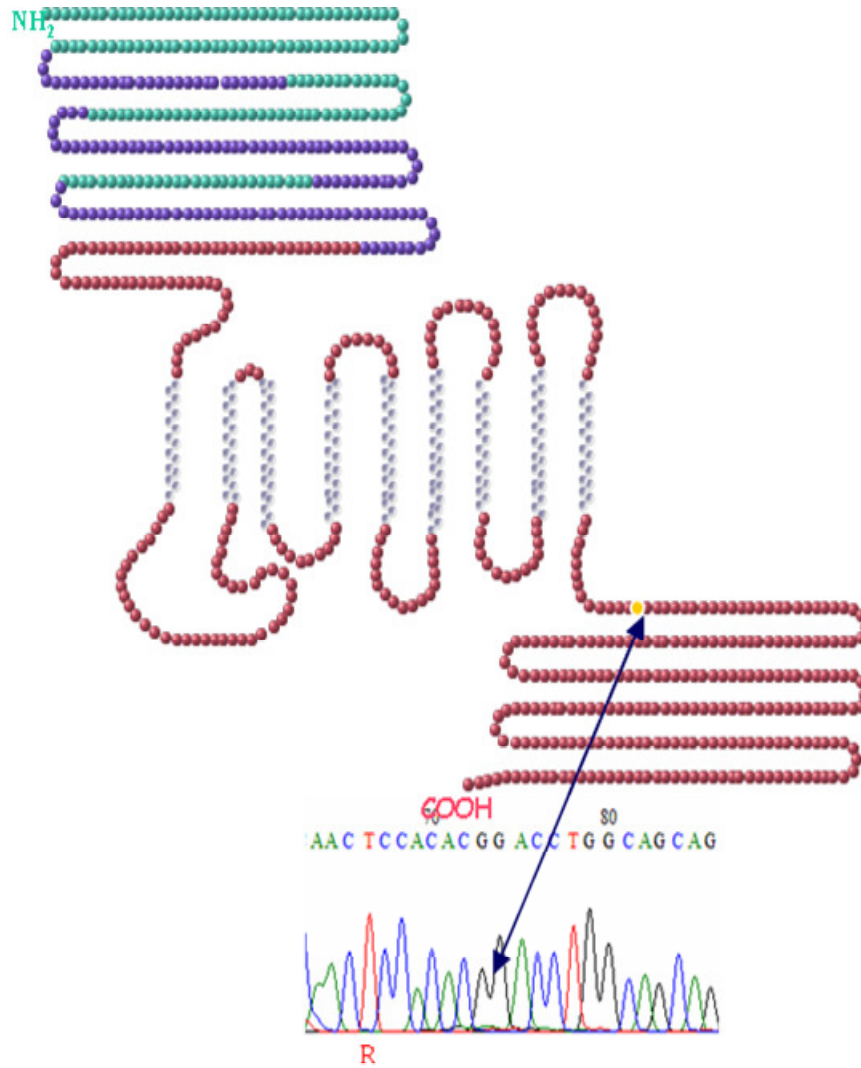
Alelos - Pai	A	B
c.1991T>C (p. Leu664Arg)	+	-
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	- (CGC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	+ (TCG)

Alelos - Mãe	C	D
c.1991T>C (p. Leu664Arg)	+	-
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	- (CGC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	+ (TCG)

P19 e P20	A	C
c.1991T>C (p. Leu664Arg)	+	+
c.1367G>A (p.Arg456His)	+ (CAC)	+ (CAC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	- (CGC)
c.2433G>A (p.=)	+ (AAA)	+ (AAA)
c.2565A>G (p.=)	+ (TCG)	+ (TCG)

Tio paterno: sem mutação **c.1991T>C (p. Leu664Arg)**

c.1991T>C (p.Leu664Arg) homozigose



```

Query:    62  actccacacggacctggcagcagtatggtgcgctgtg
          |||
Sbjct:   2152 actccacactgacctggcagcagtatggtgcgctgtg
wolframin 661 N S T L T W Q Q Y G A L C
    
```

Família 15

P21: sexo masculino, 26 anos.

Procedência: São Paulo - SP.

Diagnósticos:

- DM: 8 anos, tratamento com insulina.
- AO: 13 anos. Retinopatia diabética não proliferativa, catarata ambos os olhos.
- DI: assintomático.
- DA: 26 anos, sem prótese auditiva.
- Bexiga neurogênica: 13 anos, auto-cateterismo intermitente indicado, porém realizado esporadicamente. Infecção urinária de repetição.
- Hipogonadismo hipergonadotrófico.
- Hipertensão arterial sistêmica.
- Lipomas angiomasos em tronco e membros; escoliose coluna torácica; baixa implantação de orelhas, com rotação posterior; hipertelorismo; epicanto; abdome globoso.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: dilatação cálico-pieloureteral bilateral acentuada (hidronefrose grau IV). Rins com dimensões aumentadas, com afilamento cortical. Bexiga com paredes espessadas, trabeculadas e com divertículos.
- Estudo urodinâmico: compatível com distúrbio de contratilidade detrusora (bexiga flácida).
- Cintilografia renal dinâmica: função glomerular prejudicada à esquerda
- Eletroencefalograma normal.

P22: sexo masculino, óbito aos 24 anos.

Procedência: São Paulo – SP.

Diagnósticos:

- DM: 6 anos, tratamento com insulina.
- AO: 13 anos, com retinopatia diabética não proliferativa. Catarata subcapsular posterior em ambos os olhos.
- DI: assintomático.
- DA: audiometria não realizada.
- Bexiga neurogênica 17 anos, auto-cateterismo intermitente indicado, porém realizado esporadicamente. Infecção urinária de repetição.
- Hipogonadismo hipergonadotrófico.
- Neuropatia periférica: tratamento com carbamazepina.
- Asma brônquica na infância.
- Avaliação do serviço de genética humana: Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, microssomia, epicanto, hipertelorismo, hipoplasia das hélices auriculares, tórax em escudo, abdome globoso.
- Avaliação da ortopedia: patelas luxáveis; suspeita de agenesia bilateral dos ligamentos cruzados.
- Internação aos 17 anos com diagnóstico de abdome agudo obstrutivo; episódio de suboclusão intestinal com 23 anos.
- Óbito: paciente internou em outro serviço com dor abdominal. Foi submetido à laparotomia exploradora, sem causa definida para dor abdominal. Após 4 dias evoluiu com febre, septicemia e óbito após alguns dias de internação.

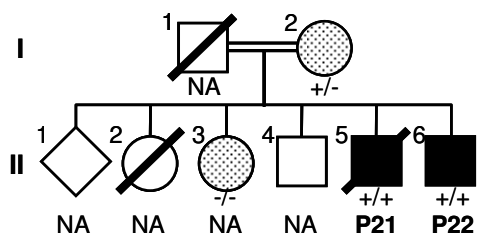
Exames Complementares:

- Radiografia de trânsito e morfologia de delgado (21 anos): áreas ileais dilatadas, com espessamento do pregueamento mucoso. Leve espasmo em jejuno proximal. (Jejunite?/ Esclerodermia?/ Verminose?). Displasia de quadril bilateral, colo femural valgo.
- Clearance de creatinina aos 17 anos: 35 ml/ min; creatinina plasmática = 2,1 mg/dL.
- Avaliação nefrologia: Insuficiência renal crônica possivelmente por nefrite intersticial induzida pelo refluxo urinário.
- Proteinúria: indetectável.

- US vias urinárias: moderada dilatação cálico-pieloureteral bilateral.
- US testículos: testículos com dimensões reduzidas.
- Cintilografia renal: função renal preservada à direita e deprimida em grau moderado/ acentuado à esquerda.

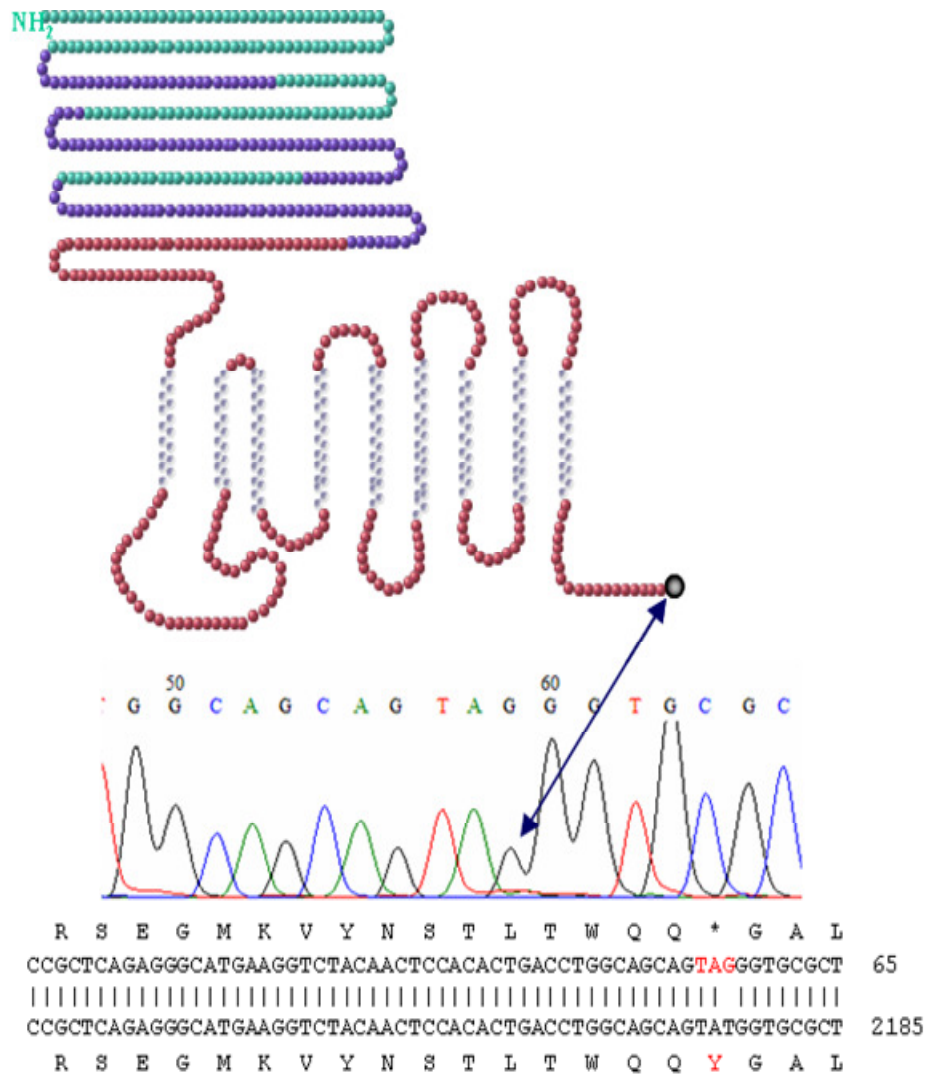
Antecedentes Familiares:

- Pais primos em primeiro grau, procedentes de Água Branca – AL.
- Pai: falecido em acidente automobilístico, sem diagnóstico de DM.
- Mãe: assintomática
Tolerância à glicose normal.
- Irmãos: II.1: óbito fetal com 8 meses de gestação.
II.2: óbito com 11 meses de vida por meningite.
II.3: assintomática, TOTG normal.
II.4: assintomático, não avaliado.
- Tia paterna com carcinoma papilífero de tireóide. TOTG normal.
Realizado sequenciamento do gene WFS1.



Tia paterna	A	D
c.2007T>G (p. Tyr669X)	+	-
P21 e P22	A	C
c.2007T>G (p. Tyr669X)	+	+
Mãe	C	D
c.2007T>G (p. Tyr669X)	+	-
Irmã: II.3	B	D
c.2007T>G (p. Tyr669X)	-	-

c.2007T>G (p.Tyr669X) homozigose



Família 16

P23: sexo feminino, 23 anos.

Procedência: Maringá – PR.

Diagnósticos:

- DM: 8 anos, tratamento com insulina.
- AO: 7 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: assintomática, densidade urinária normal.
- DA: 18 anos, sem prótese auditiva.
- Trato urinário: assintomática.
- Desenvolvimento puberal: menarca 15 anos.

Exames Complementares:

- Proteinúria 24 h: 206 mg/ 24h.

P24: sexo feminino, 19 anos.

Procedência: Maringá – PR.

Diagnósticos:

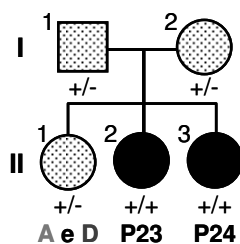
- DM: 8 anos, tratamento com insulina.
- AO: 8 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: assintomático.
- DA: 21 anos, em uso de prótese auditiva desde 17 anos; zumbido desde 8 anos.
- Trato urinário: com 8 anos foi submetida à cirurgia para correção de estenose de uretra. Com 10 anos iniciou auto-cateterismo intermitente e antibioticoterapia profilática.
- Desenvolvimento puberal: menarca 15 anos.
- Reflexo convulsivo no estômago, aos 9 anos. Tratamento com fenobarbital por 6 meses.

Exames complementares:

- Urografia excretora e estudo urodinâmico: uretero-hidronefrose bilateral, bexiga neurogênica.
- Proteinúria 24h: 184 mg/24h.
- Eletroencefalograma aos 23 anos: traçado de fundo normal, presença de escassa atividade espicular esquerda com tendência à difusão.
- Eletroencefalograma aos 24 anos: normal.

Antecedentes Familiares:

- Pais não consangüíneos, procedentes de Maringá - PR.
- Pai:
Tolerância à glicose normal.
- Mãe:
Tolerância à glicose normal.

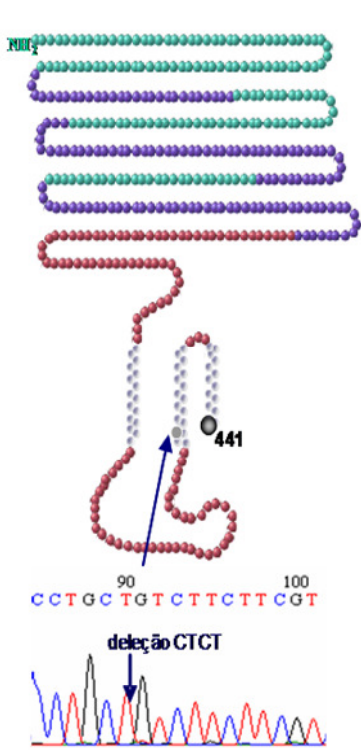


Alelos – Pai	A	B
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	-	-
c.2643_2646delCTTT (p.Phe882SerfsX69)	+	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1500C>T (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)

Alelos – Mãe	C	D
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.2643_2646delCTTT (p.Phe882SerfsX69)	-	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1500C>T (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)

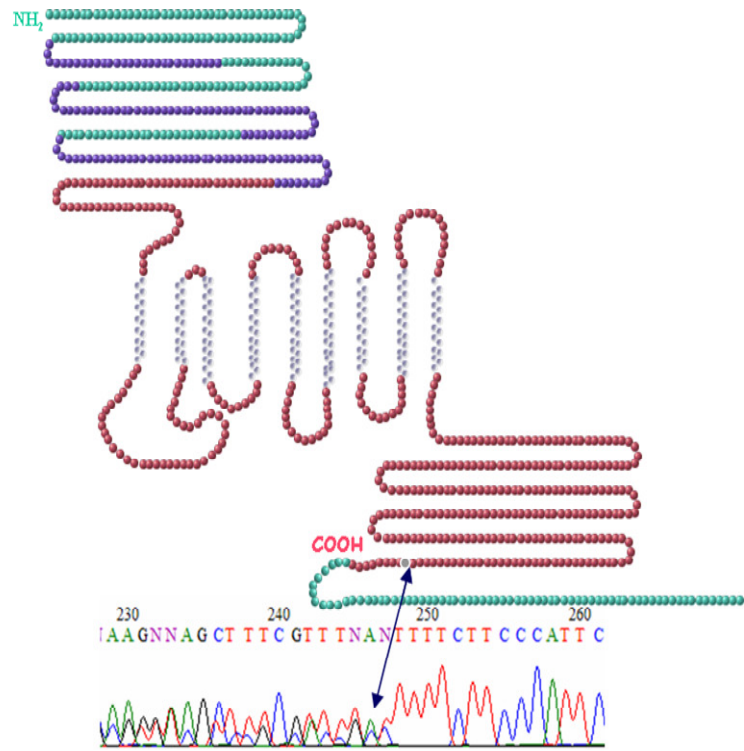
P23 e P24	A	C
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	-	+
c.2643_2646delCTTT (p.Phe882SerfsX69)	+	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1500C>T (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)

c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)



20 L E P Y A H F L L
 61 TGGAGCCCTATGCCCAITTCCTGCT --- GTCIT
 |||
 1375 TGGAGCCCTATGCCCAITTCCTGCTCTCTGTCIT
 402 L E P Y A H F L L S V F

c.2643_2646delCTTT (p.Phe882SerfsX69)



41 W R S T V H G A V K F A F D
 121 CTGGCGCAGCACCGTGCATGGCGCCGTGAAGTTCGCCTTCGAC --- TTTTCTTCCATT 176
 |||
 2768 CTGGCGCAGCACCGTGCATGGCGCCGTGAAGTTCGCCTTCGACTTCTTTTCTTCCATT 2827
 867 W R S T V H G A V K F A F D F F F F F F

Família 17

P25: sexo feminino, 19 anos.

Procedência: Atualmente reside em Vinhedo – SP. Nascimento Iaporã – PR.

Diagnósticos:

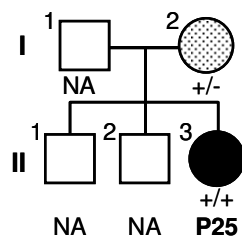
- DM: 2 anos, tratamento com insulina.
- AO: 7 anos, sem retinopatia diabética; catarata subcapsular posterior bilateral; glaucoma.
- DI: assintomática, densidade urinária normal.
- DA: 14 anos, com prótese auditiva.
- Atonia do trato urinário: 7anos, auto-cateterismo intermitente desde 12 anos. Infecção urinária de repetição.
- Desenvolvimento puberal: menarca 16 anos.
- Polineuropatia periférica; ataxia.
- Crises convulsivas desde 2 anos, associadas à hipoglicemia. 1 episódio de convulsão com glicemia normal. Em tratamento com carbamazepina.

Exames Complementares:

- Estudo urodinâmico: hiposensibilidade vesical; diminuição da força de contração do detrusor; resíduo pós-miccional (415 ml).
- Urografia excretora: hidronefrose bilateral.
- Cintilografia renal estática: função tubular relativa preservada à esquerda e deprimida em grau discreto à direita; sinais de cicatrizes renais e dilatação pielocalicial bilateral, mais acentuada à esquerda.
- Cintilografia renal dinâmica: déficit importante de eliminação bilateralmente às custas das retenções pielocaliciais e sem resposta à ação do diurético; ritmo de filtração glomerular preservado à esquerda e deprimido à direita em grau discreto.
- Albuminúria 24h: 19,8 mg/24h.
- Clearance de creatinina: 36,6 ml/min. Creatinina plasmática = 1,5.

Antecedentes Familiares:

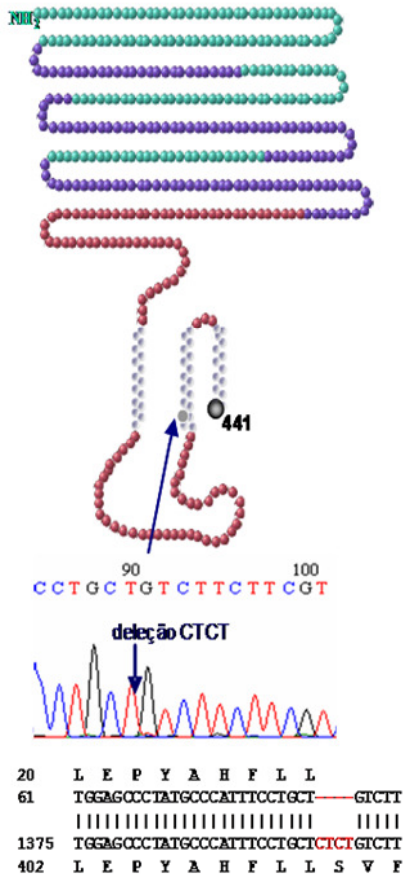
- Pais não consangüíneos, procedentes de Manuadaguaçu - PR.
- Pai: assintomático; não avaliado.
- Mãe:
Tolerância à glicose normal.
- Avó materna com DM
- Primo em segundo grau com DM1 e deficiência visual.



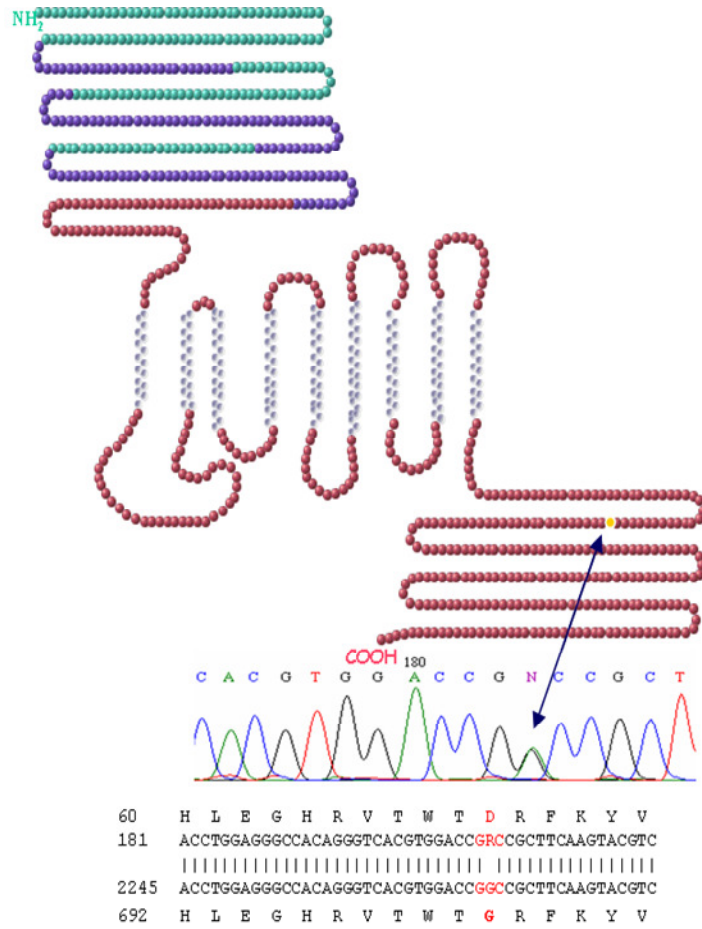
Alelos – Mãe	C	D
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.2105G>A (p.Gly702Asp)	-	-
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	- (CGC)
c.2267G>A (p.Arg756His)	- (CGC)	- (CGC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	- (AAG)

P25	C	D
c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)	+	-
c.2105G>A (p.Gly702Asp)	-	+
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	- (CGG)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	- (ATC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	- (GTT)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	- (AAT)
c.1832G>A (p.Arg611His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2267G>A (p.Arg756His)	- (CGC)	+ (CAC)
c.2433G>A (p.=)	- (AAG)	+ (AAA)

c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29)



c.2105G>A (p.Gly702Asp)



Família 18

P26: sexo masculino, 39 anos.

Procedência: Reside em São Paulo - SP desde 18 anos; procedente de São Bento do Una - PE.

Diagnósticos:

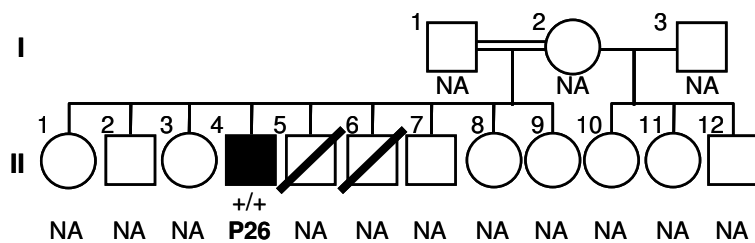
- DM: 27 anos, tratamento com glibenclamida 5 mg/dia.
- AO: 19 anos,
- DI: assintomático.
- DA: 39 anos; perda auditiva discreta em 6 e 8 KHz bilateral.
- Bexiga neurogênica 33 anos, sem cateterismo vesical.
- Disfunção erétil desde 28 anos.

Exames Complementares:

- US vias urinárias: moderada dilatação pielocalicial bilateral; bexiga com paredes espessadas e trabeculadas.
- Albuminúria 12h noturna: 6,4 µg/min.

Antecedentes Familiares:

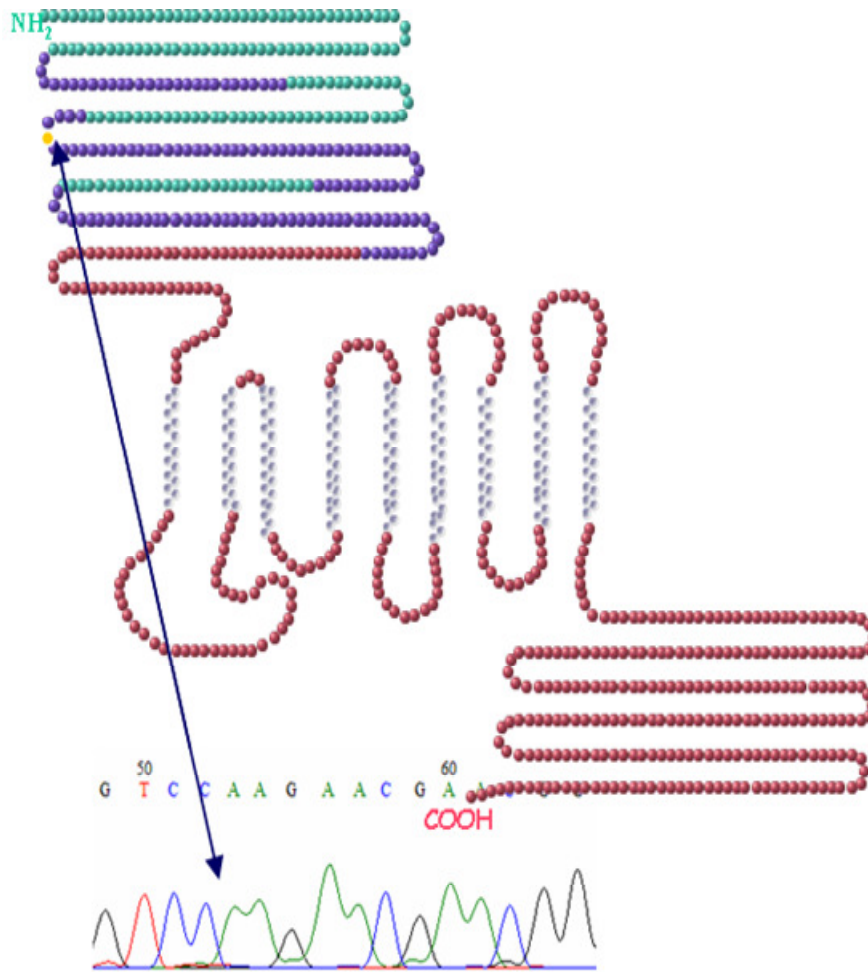
- Pais primos em primeiro grau, procedentes de São Bento do Una – PE.
- Pai: não avaliado.
- Mãe: não avaliada.
- Irmãos: não avaliados.
- Sem história familiar de DM.



P26

c.472G>A (p.Glu158Lys)	+	+
c.684G>C (p.=)	+ (CGC)	+ (CGC)
c.997A>G (p.Ile333Val)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1185T>C (p.=)	+ (GTC)	+ (GTC)
c.1500T>C (p.=)	+ (AAC)	+ (AAC)

c.427G>A (p.Glu158Lys) homozigose



```

1   G I T S K N E R E V R Q L
27  AGGCATCACGTCCAAGAACGAACGGGAGGTGAGGCAGCTC
   |||
629 AGGCATCACGTCCGAGAACGAACGGGAGGTGAGGCAGCTC
154 G I T S E N E R E V R Q L
    
```

Família 19

P27: sexo masculino, 12anos.

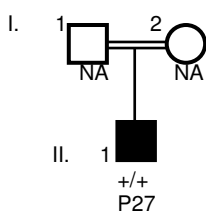
Procedência: Vitória – ES.

Diagnósticos:

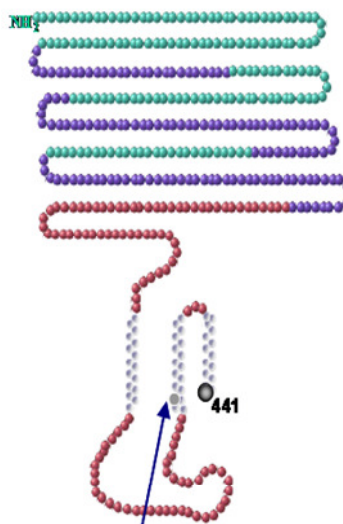
- DM: 1,5 anos, tratamento com insulina.
- AO: 7 anos, sem retinopatia diabética.
- DI: assintomático.
- DA: assintomático, audiometria não realizada.
- Alteração no trato urinário desde 7anos.

Antecedentes Familiares:

- Adotado
- Pais consangüíneos, não avaliados

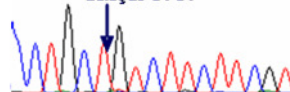


c.1230_1233delCTCT (p.Val412SerfsX29) homozigose



90 100
CCTGC TGTCTTCTT CGT

deleção CTCT



```
20  L E P Y A H F L L
61  TGGAGCCCTAIGGCCAITTCCTGCT—GCTT
    |||
1375 TGGAGCCCTAIGGCCAITTCCTGCTCTCTGCTT
402  L E P Y A H F L L S V F
```

PUBLICAÇÕES

Periódicos

RIBEIRO MR, CRISPIM F, VENDRAMINI MF, MOISES RCMS. Síndrome de Wolfram: da definição às bases moleculares. Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50:839-844.

RIBEIRO MRF, MOISES RS. Obesidade. Rev Bras Med 2006;63:143-152.

VIEIRA TC, CHINEN RN, **RIBEIRO MRF**, NOGUEIRA RG, ABUCHAM J. Central Precocious Puberty Associated with Pituitary Duplication and Midline Defects. J Pediatr Endocrinol Metab 20, 2007 (in press)

GASPARIN MR, CRISPIM F, PAULA SL, FREIRE MB, DALBOSCO IS, MANNA TD, SALLES JE, GASPARIN F, GUEDES A, MARCANTONIO JM, GAMBINI M, SALIM CP, MOISÉS RS. Identification of novel mutations of the WFS1 gene in Brazilian patients with Wolfram syndrome. Eur J Endocrinol. 2009;160:309-16.

Capítulo de livro

RIBEIRO MRF, MORY DB, VENDRAMINI MF, GIUFFRIDA F, DIB SA, MOISES RCMS, CHACRA AR. Diabetes Melito. In: Antonio Carlos Lopes. (Org.). Tratado de Clínica Médica. 1a. ed. São Paulo: Editora Roca, 2006, v. II, p. 3570-3597.

Resumos publicados

RIBEIRO, MRF; CRISPIM, F; KASAMATSU, T; MOISES, RCMS. Identificação de novas mutações no gene WFS-1 e correlação fenótipo-genótipo em portadores da Síndrome de Wolfram. 6º Congresso Paulista de Endocrinologia e Metabolismo. Arq Bras Endocrinol Metabol 2005;49(supl 1):S87.

RIBEIRO, MRF; CRISPIM, F; KASAMATSU, TS; RODRIGUES, MLD; PAULA, SLF; MOISES, RCMS. Identificação de novas mutações no gene WFS-1 e

correlação fenótipo-genótipo em portadores da Síndrome de Wolfram. XV Congresso Brasileiro de Diabetes. Arq Bras Endocrinol Metabol 2005;49(supl 2):S892.

NATRIELI_CHINEN R, **RIBEIRO MRF**, LANA JM, ABUCHAM J and VIEIRA TC. Pituitary duplication should be listed as a “cause” of central precocious puberty in girls. In: Program and abstracts. The Endocrine Society 88th. Annual Meeting. Endocrine Society Press 2006;1:573.

NATRIELI_CHINEN R, **RIBEIRO MRF**, LANA JM, ABUCHAM J and VIEIRA TC. Pituitary duplication should be listed as a “cause” of central precocious puberty in girls. XIII Simpósio Internacional de Neuroendocrinologia. Arq Bras Endocrinol Metabol 2006;50:S48.

RIBEIRO, MRF; CRISPIM, F; KASAMATSU, TS; MOISES, RCMS. Identificação de novas mutações no gene WFS-1 em portadores da Síndrome de Wolfram. VII Congresso Paulista de Diabetes. Arq Bras Endocrinol Metabol 2006;50: S164.

GASPARIN MRFR. Síndrome de Wolfram: heterogeneidade clínica e genética. 7^o Congresso Paulista de Endocrinologia e Metabolismo. Arq Bras Endocrinol Metabol 2007;51/3:S61.

GASPARIN MRFR, CRISPIM F, PAULA SLFM, MARCANTONIO JM, FREIRE MBS, DALBOSCO IS, DELLA MANNA T, GUEDES AD, GASPARIN F, SALLES JE, GAMBINI M, MOISÉS RS. Identificação de nove novas mutações no gene WFS1 em portadores da Síndrome de Wolfram. XVI Congresso Brasileiro de Diabetes. Arq Bras Endocrinol Metabol 2007;51/7:S498.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)