# LUCIMARY CAVALCANTE GURGEL

# DIABETES MELLITUS TRANSITÓRIO E PERMANENTE NO PRIMEIRO ANO DE VIDA: ESTUDO DAS BASES GENÉTICAS

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

# **Livros Grátis**

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

# LUCIMARY CAVALCANTE GURGEL

# DIABETES MELLITUS TRANSITÓRIO E PERMANENTE NO PRIMEIRO ANO DE VIDA: ESTUDO DAS BASES GENÉTICAS

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

Orientadora

Profa. Dra. Regina C. M. Santiago Moisés

# FICHA CATALOGRÁFICA

Gurgel, Lucimary Cavalcante

Diabetes mellitus transitório e permanente no primeiro ano de vida: Estudo das bases genéticas / Lucimary Cavalcante Gurgel -- São Paulo, 2010.

v, 50f

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

Título em inglês: Transient and Permanent Diabetes Mellitus in the first year of life: Genetic Basis Study.

1. Diabetes mellitus; 2. Canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>; 3. KCNJ11

# **SUMÁRIO**

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
ARTIGO 1:	
Diabetes Neonatal: da Definição às Bases Moleculares	10
OBJETIVOS	28
ARTIGO 2:	
Pesquisa de Mutações nos Genes KCNJ11 e ABCC8 em	
Portadores de Diabetes Mellitus Diagnosticado no Primeiro Ano	
de Vida	29
ARTIGO 3:	
Sulfonylrea Treatment in Permanent Neonatal Diabetes Due to	
G53D Mutation in the KCNJ11 Gene	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
CONCLUSÕES	51
Anexos	

#### **DEDICO ESTE TRABALHO**

Ao Luiz, meu marido, por todo amor, carinho, companheirismo e compreensão, que tornou o meu trabalho menos pesado e compartilhou dificuldades e expectativas;

À minha filhinha Júlia que mudou completamente minhas prioridades e trouxe muita felicidade como uma prova do amor de Deus em nossas vidas;

Aos meus amados pais, pela preocupação em todos os momentos, por todo o carinho, pelo apoio constante e incentivo em todas as decisões que tomei, por serem meus guias apesar da distância;

Ao meu irmão, minha cunhada e sobrinhos pela amizade, pelo estímulo e torcida em cada um de meus passos, e por todo carinho;

E à minha irmã de quem sempre terei uma saudade infinita.

Aos Tios Jacílio e Araci pelo enorme carinho, pelo incentivo;

À grande amiga Rose Dawne pela amizade inestimável e ajuda a mim concedida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tão grande amor a mim demonstrado e por todas as bênçãos concedidas;

À minha orientadora Profa Dra Regina Célia Santiago Moisés pelas oportunidades, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e pela orientação criteriosa.

Ao Dr Márcio pelos ensinamentos valiosos e pelo incentivo para o início da pós- graduação;

Ao Felipe que com toda capacidade e paciência sempre demonstradas me ensinou desde o início tudo que eu precisei para realizar os procedimentos no laboratório necessários para realização deste trabalho;

À amiga Maria Regina pelo apoio, simpatia, experiências compartilhadas e pela amizade;

À Teresa e Ilda pela paciência, pelos ensinamentos e pela ajuda inestimável:

Aos colegas do Laboratório de Endocrinologia Molecular: Giba, Flávia, Gisele, Mariana, Rosana, pela ajuda inestimável;

Ao Prof. Dr Sérgio Atala Dib pela oportunidade concedida para iniciar a pós-graduação;

Aos médicos Dr Ivaldir Sabino Dalbosco, Dr Antônio Pires e Dra Teresa que contribuíram para o aumento de nossa casuística;

Aos residentes da Endocrinologia da UNIFESP pelo encaminhamento de pacientes e ajuda durante a internação de pacientes na Enfermaria;

Às secretárias Ângela, Amaryllis e Margarete pela simpatia e eficiência;

À equipe do Centro de Diabetes: Michele pela realização das coletas de sangue dos pacientes e familiares; Célia, Ana, Vera pela ajuda no atendimento dos pacientes;

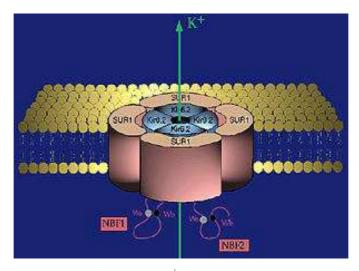
Finalmente, um agradecimento especial aos pacientes e voluntários, pela inestimável contribuição, fundamentais para realização deste trabalho. Muito Obrigada!

# **INTRODUÇÃO**

O diabetes neonatal (DN) é uma condição rara com incidência estimada de 1 em 400.000 a 500.000 neonatos<sup>(1,2)</sup>. É definido como a presença de hiperglicemia, que necessita de insulinoterapia, nos primeiros meses de vida. Em aproximadamente metade dos casos o DN é transitório entrando em remissão em média dentro de 3 meses e podendo recidivar durante a infância ou adolescência, enquanto na outra metade dos casos o DN é permanente.

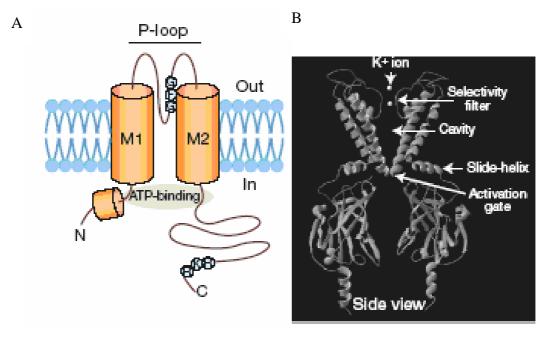
## Canais de potássio ATP-sensível

Os canais de potássio ATP-sensível ( $K^+_{ATP}$ ), presentes em diferentes tipos de células, acoplam o metabolismo celular à atividade elétrica da membrana plasmática através da regulação do fluxo de  $K^+$ . Na célula  $\beta$  pancreática esses canais fazem a ligação entre alterações nas concentrações de glicose no sangue com a secreção de insulina<sup>(3)</sup>. Estruturalmente, trata-se de um complexo hetero-octamérico composto por quatro sub-unidades Kir6.2 (*inwardly rectifying potassium channels*) e quatro sub-unidades regulatórias SUR1 (*sulphonylurea receptor*) presentes nas células  $\beta$  pancreáticas. Na Figura 1 é apresentada esquematicamente a estrutura do canal de potássio ATP-sensível ( $K^+_{ATP}$ ) da célula  $\beta$  pancreática com as sub-unidades Kir6.2 e SUR1 que o compõem.



**Figura 1**:Representação esquemática do canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>. Notar sua estrutura hetero-octmérica composta pelas sub-unidades Kir6.2 e SUR1 (reproduzido de Bataille E, Drug New Perspect 13:453, 2000)

O Kir6.2 forma o poro altamente seletivo ao íon K+ que compõe o  $K^+_{ATP}^{(4)}$ . Essa subunidade é composta por duas porções transmembrana (M1 e M2) e entre essas porções encontra-se uma alça extracelular que contém a sequência de peptídeos GFG responsável pelo transporte seletivo de potássio chamada de  $K^+$  selectivity filter<sup>(3)</sup>. A abertura do canal em resposta a uma diminuição na razão ATP/ADP permite a entrada de íons (predominantemente cátions) no poro, entretanto o "selectivity filter" permite somente a passagem de íons  $K^+$  da cavidade para a face extracelular do poro. Uma pequena hélice chamada slide helix, que precede o primeiro domínio transmembrana (M1), tem um papel chave no controle do fechamento e abertura do canal, um processo determinado "gating". A porção intracelular do Kir6.2 contém o sítio de ligação do ATP que exerce efeito inibitório sobre o canal (Figura 2).



**Figura 2:** A: Representação esquemática da sub-unidade Kir6.2 que contém duas porções transmembrana (M1 e M2) e um grande domínio citoplasmático que contém o sítio de ligação do ATP. B: modelo estrutural do Kir6.2 em visão lateral

O SUR1 pertence à subfamília de proteínas *ATP* -binding cassete (*ABC*) transporter e conforme mostrado na Figura 1 o SUR1 localiza-se na periferia do canal. Possui 17 alças transmembrana arranjadas em grupos de 5, 6 e 6, que são os domínios transmembrana TMD0, TMD1 e TMD2, respectivamente<sup>(5)</sup>.

TMD0 interage fisicamente e funcionalmente com o Kir6.2 para modular abertura e fechamento do poro<sup>(3)</sup>. A porção citoplasmática do SUR1 contém dois domínios de ligação dos nucleotídeos (NBFs – *nucleotide-binding folds*), NBF1 e NBF2 respectivamente, que participam da ligação e hidrólise dos nucleotídeos<sup>(6,7,8)</sup>. SUR1 também contém sítios de ligação para drogas que abrem os canais de potássio tais como diazóxido e para inibidores como sulfoniluréia, tolbutamida e glibenclamida (Figura 3).

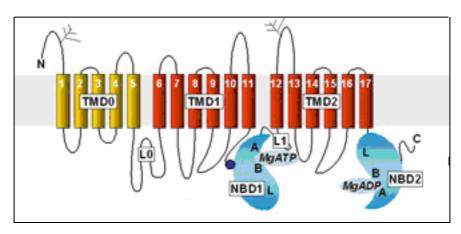


Figura 3: Representação esquemática do SUR1

## Canal de Potássio ATP-dependente e secreção de insulina:

Aumento dos níveis de glicose no sangue resulta em aumento na difusão passiva facilitada de glicose via proteína transportadora de glicose GLUT2 pelas células β pancreáticas. No intracelular essa glicose é metabolizada levando ao aumento da concentração intracelular de ATP em relação ao ADP. Esse aumento na razão ATP/ADP promove o fechamento dos canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> resultando em despolarização da membrana plasmática da célula β pancreática. A despolarização da membrana leva a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente е 0 resultante influxo de cálcio consequentemente aumento da concentração intracelular de cálcio, resulta em exocitose dos grânulos de insulina. Portanto, os canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> têm um papel central na regulação da secreção de insulina em resposta a flutuações nos níveis glicêmicos. A atividade do canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> é controlada por mudanças nas concentrações citosólicas de nucleotídeos via Kir6.2 e SUR1. Em seu estado livre o ATP inibe o canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> através da ligação com o sítio intracelular na porção carboxi terminal do Kir6.2, entretanto, na presença de Mg<sup>2+</sup> tanto MgATP quanto MgADP estimulam a atividade do canal através de ligação nos NBFs do SUR1 resultando em abertura do canal e consequentemente inibição das respostas celulares como a secreção de insulina<sup>(9,10)</sup>. Assim, o SUR1 age como uma subunidade regulatória, que é estimulada por Mg-nucleotídeos e por substâncias que abrem os canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> (como o diazóxido) e é inibida por sulfoniluréias<sup>(11,6)</sup>. Em sumário, ativação dos canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> suprime a secreção de insulina, enquanto a sua inativação promove secreção de insulina.

Mutações que levam a redução da função do canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> (mutações inativadoras) do Kir6.2 ou do SUR1 resultam em hiperinsulinismo congênito<sup>(12)</sup>. O hiperinsulinismo congênito é uma condição rara onde os indivíduos afetados secretam excesso de insulina apesar dos baixos níveis glicêmicos<sup>(3)</sup>. A maioria das mutações inativadoras resulta da inabilidade na abertura do canal em resposta à baixa razão ATP/ADP. Em consequência, o canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> desses pacientes permanece fechado mesmo com baixos níveis glicêmicos, levando a uma secreção descontrolada de insulina.

Em contraste, nas mutações ativadoras esses canais permanecem abertos, mesmo na presença de altas concentrações de glicose, mantendo a célula β pancreática hiperpolarizada, condição na qual a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas é quase completamente suprimida<sup>(13)</sup>.

## Canal de potássio ATP-sensível e diabetes neonatal

Os genes *KCNJ11* e *ABCC8* que codificam, respectivamente, as subunidades Kir6.2 e SUR1 do canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> estão localizados no cromossomo 11p15.1. Esses genes estão sob o controle de uma região promotora comum e são regulados pelos mesmos fatores de transcrição incluindo o fator de transcrição Foxa2, permitindo que a expressão de ambos os genes seja associada<sup>(3)</sup>. Em 2004 Gloyn e col descreveram pela primeira vez a associação de mutações no gene *KCNJ11* com DN permanente<sup>(14)</sup>. Desde então vários outros estudos reportaram mutações nesse gene como causa de DN, sendo reconhecido que mutações ativadoras missense em heterozigose no gene *KCNJ11* são a causa mais comum de diabetes neonatal permanente<sup>(15)</sup>. Além do diabetes mellitus alterações neurológicas estão presentes em cerca de 20%

a 30% dos pacientes. A forma mais grave consiste em retardo no desenvolvimento, epilepsia e fraqueza muscular, tendo sido proposto o nome de Síndrome DEND (*developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes*)<sup>(19)</sup>. Uma forma mais branda consiste em DN, retardo no desenvolvimento e/ou fraqueza muscular e ausência de epilepsia, sendo referida como Síndrome DEND Intermediária. Posteriormente identificou-se que mutações ativadoras no gene *ABCC8*, que codifica a outra sub-unidade do canal de potássio ATP-dependente, SUR1, são também causas de DN<sup>(16)</sup>.

Há ainda evidências de uma relação fenótipo-genotipo para as mutações no gene *KCNJ11*. Verificou-se que a localização da mutação pode influenciar o fenótipo<sup>(14,17)</sup>. Mutações que ocorrem nos resíduos localizados próximos ao sítio de ligação do ATP (R50, I192, R201, F333, L164, Y330) ou estão na interface entre as sub-unidades Kir6.2 (F35, C42 e E332) ou entre o Kir6.2 e o SUR1 (G53) são mais frequentemente associadas com diabetes neonatal isolado<sup>(17)</sup>. Enquanto mutações que ocorrem em resíduos distantes do sítio de ligação do ATP (Q52, V59, C166, I296) causam também alterações neurológicas além do diabetes neonatal<sup>(17)</sup>. Entretanto, essa correlação não é absoluta uma vez que pacientes apresentando a mesma mutação podem apresentar diferenças fenotípicas indicando que outros fatores, genéticos e/ou ambientais, ainda não esclarecidos podem influenciar o fenótipo<sup>(18)</sup>.

Existe também uma correlação entre as características funcionais da mutação do gene *KCNJ11* e as características clínicas. Todas as mutações estudadas resultam em redução marcante da habilidade do ATP em bloquear os canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, porém o mecanismo molecular pelo qual a sensibilidade ao ATP da subunidade Kir6.2 é reduzida varia entre as mutações<sup>(17)</sup>. Estudos mostram que a maioria das mutações associadas com diabetes neonatal isolado promove uma inibição do canal ATP-dependente sem alterar muito a fração de tempo que o canal gasta em estado aberto na ausência de ATP (probabilidade intrínseca de abertura - P<sub>o</sub>)<sup>(19,20)</sup>. Enquanto mutações associadas com características neurológicas aumentam a probabilidade intrínseca de abertura, mantendo o canal no estado aberto, reduzindo indiretamente a habilidade do ATP em bloquear o canal<sup>(19,21)</sup>. A gravidade do defeito funcional da mutação do Kir6.2 correlaciona-se com a apresentação clínica<sup>(4)</sup>: as mutações associadas à Síndrome DEND mostram uma redução

mais profunda na resposta ao ATP, quando comparadas às mutações associadas ao diabetes neonatal permanente isolado, que por sua vez possuem um defeito funcional mais grave que mutações associadas ao diabetes neonatal transitório<sup>(22)</sup>. Foi observado que algumas mutações do Kir6.2, além de reduzirem esse efeito inibitório do ATP, parecem aumentar a estimulação do MgATP mediada via SUR1<sup>(19, 20)</sup>.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Von Muhlendahl KE, Herkenhoff H. Long-term course of neonatal diabetes. N Engl J Med 1995; 333:704-708.
- 2. Shield JP, Gardner RJ, Wadswoth EJK, Whiteford ML, James RS, Robinson DO, Baum JD, Temple IK. Aetiopathology and genetic basis of neonatal diabetes. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1997; 76(1):F39-42.
- Smith AJ, Taneja TK, Mankouri J, Sivaprasadarao A. Molecular cell biology of KATP channels: implications for neonatal diabetes. Expert Rev Mol Med 2007; 1;9(21):1-17.
- Proks P, Arnold AL, Bruining J, Girard C, Flanagan SE, Larkin B, Colclough K, Hattersley AT, Aschroft FM, Ellard S. A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. J Hum Mol Genet 2006: 15:1793-1800.
- Suzuki S, Makita Y, Mukai T, Matsuo K, Ueda O, Fujieda K. Molecular Basis of Neonatal Diabetes in Japanese Patients. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92(10):3979-85.
- Nichols CG, Shyng SL, Newtorowicz A, Glaser B, IV JPC, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J. Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 1996; 272:1785–1787.
- 7. Gribble FM, Tucker SJ and Ashcroft FM. The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. EMBO1997; 16: 1145 1152.
- 8. Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K+ channels. Prog Biophys Mol Biol 2003; 81:133-76.
- 9. Miki T, Seino S. Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. J Mol Cell Cardiol. 2005; 38(6):917-25.

- 10. Ashcroft FM. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. The Journal of Clinical Investigation 2005; 115(8):2047-58.
- 11. Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K\_ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 1997. 387:179 –183.
- 12. Hussain K. Congenital hyperinsulinism. Semin Fetal Neonatal Med. 2005; 10(4):369-76.
- 13. Skupien J, Malecki M.T, Mlynarski W, Klupa T, Wanic K, Gach A, Solecka I, Sieradzki J. Assessment of Insulin Sensitivity in Adults with Permanent Neonatal Diabetes Mellitus due to Mutations in the KCNJ11 gene Encoding Kir6.2. The Review of Diabetic Studies 2006; 3:17-20.
- 14. Gloyn AL, Pearson ER, Anticliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JMCL, Molnes J, Edghill E, Frayling TM, Temple K, Mackay D, Shield JPH, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JKH, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Aschcroft F, Hattersley AT. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. N Engl J Med 2004; 350:1838-1849.
- 15. Slingerland AS, Hattersley AT. Mutations in the Kir6.2 subunit of the KATP channel and permanent neonatal diabetes: new insights and new treatment. Ann of Medicine 2005; 37:186-195.
- 16. Babenko AP, Polak M, Cavé H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguillar-Bryan L, Vaxillaire M, Froguel P. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. N Engl J Med 2006; 355:456-466.
- 17. Hattersley AT, Aschroft FM. Activating Mutations in Kir6.2 Neonatal Diabetes: New Clinical Syndromes, New Scientific Insights and New Therapy. Diabetes 2005; 54(9):2503-13.

- 18. Flanagan SE, Edghil EL, Gloyn AL, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in KCNJ11, which encodes Kir6.2, are a common cause of diabetes diagnosed in the first 6 months of life, with the phenotype determined by genotype. Diabetologia 2006; 49:1190-1197.
- 19. Proks P, Girard C, Haider S, Gloyn AL, Hattersley AT, Sansom SP, Ashcroft FM. A gating mutation at the internal mouth of the Kir6.2 pore is associated with DEND syndrome. EMBO Rep 2005; 6:470-475.
- 20.Tammaro P, Girard C, Molnes J, Njølstad PR, Ashcroft FM. Kir6.2 mutations causing neonatal diabetes provide new insights into Kir6.2-SUR1 interactions. *EMBO J* 2005; 24(13):2318-30.
- 21.Trapp S, Proks P, Tucker SJ, Ashcroft FM. Molecular analysis of ATPsensitive K channel gating and implications for channel inhibition by ATP. *J Gen Physiol* 1998; 112:333–349.
- 22. Gloyn AL, Reimann F, Girard C, Edghill EL, Proks P, Pearson ER, Temple K, Mackay DJG, Shield JPH, Freedenberg D, Noyes K, Ellard S, Aschcroft FM, Gribble FM, Hattersley AT. Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in the KCNJ11. Hum Mol Genet 2005;14:925-934.

# Diabetes Neonatal: da Definição às Bases Moleculares

## Lucimary C. Gurgel, 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 – 2° andar

04034-970 São Paulo, SP, Brazil,

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

E-mail: rmoises@unifesp.br

Publicado em: Arq Bras Endocrinol Metabol 52(2):181-7, 2008

#### **ABSTRACT**

Neonatal diabetes is a rare condition characterized by hyperglycemia, requiring insulin treatment, diagnosed within the first months of life. The disorder may be either transient, resolving in infancy or early childhood with possible relapse later, or permanent in which case lifelong treatment is necessary. Both conditions are genetically heterogeneous; however, the majority of the cases of transient neonatal diabetes are due to abnormalities of an imprinted region of chromosome 6q24. For permanent neonatal diabetes, the commonest causes are heterozygous activating mutations of *KCNJ11*, the gene encoding the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive potassium channel. In this article we discuss the clinical features of neonatal diabetes, the underlying genetic defects and the therapeutic implications.

#### Resumo

Diabetes neonatal (DN) é uma condição rara caracterizada por hiperglicemia, que necessita de tratamento com insulina, diagnosticada nos primeiros meses de vida. Clinicamente pode ser classificado em DN transitório onde ocorre remissão da doença em poucos meses podendo haver recorrência posteriormente; ou permanente onde, como o nome indica, não ocorre remissão. Ambas as condições são geneticamente heterogêneas; entretanto a maioria dos casos de DN transitório é decorrente de anormalidades de uma região de *imprinted* no cromossomo 6q24. Mutações ativadoras em heterozigose no gene *KCNJ11*, que codifica a sub-unidade Kir6.2 do canal de potássio ATP-sensível, são a causa mais comum de DN permanente. No presente artigo discutimos as características clínicas do DN, os mecanismos moleculares envolvidos e suas implicações terapêuticas.

Apesar do período neonatal corresponder ao período do nascimento até o 28º dia de vida, diabetes neonatal (DN) têm sido definido na literatura como a presença de hiperglicemia, que necessita de tratamento com insulina, nos três primeiros meses de vida<sup>(1,2)</sup>. Entretanto, como sugerido por Shield<sup>(3)</sup>, em termos de idade um ponto de corte aos 6 meses parece mais apropriado uma vez que possivelmente todos os casos de diabetes mellitus diagnosticados antes dessa idade são devido a mutações em um único gene, enquanto após os 6 meses de idade diabetes mellitus tipo 1 auto-imune representa a causa mais comum da doença<sup>(4)</sup>.

O DN é uma condição rara, com incidência estimada de 1 em 400.000-500.000 nascidos vivos<sup>(5,6)</sup>. Em aproximadamente metade dos casos o DN é transitório (DNT) entrando em remissão em média dentro de 3 meses e podendo recidivar durante a infância ou adolescência, enquanto na outra metade dos casos o DN é permanente (DNP). Não existem características clínicas que possam predizer se um neonato com diabetes mellitus apresenta a forma transitória ou permanente.

#### 1. Características clínicas:

#### 1.1. Diabetes Neonatal Transitório

O DN Transitório representa cerca de 50-60% dos casos de diabetes neonatal<sup>(6,7,8)</sup>. Os indivíduos afetados desenvolvem hiperglicemia com hipoinsulinemia precocemente, com uma duração de necessidade de insulina exógena de 4 a 60 semanas, período após o qual entram em remissão<sup>(9)</sup>. Em uma grande casuística de pacientes ingleses com DNT, Temple e col. observaram uma mediana de idade de apresentação de 3 dias, com intervalo de poucas horas de vida até 31 dias<sup>(9)</sup>. Entretanto, após período variável de remissão, com resposta insulínica normal à sobrecarga intravenosa de glicose<sup>(10)</sup>, hiperglicemia permanente desenvolve durante a fase de adolescência ou adulto jovem em uma grande proporção desses indivíduos. Em um estudo francês, hiperglicemia permanente ocorreu em 5 de 7 pacientes com DNT após os 8 anos de idade<sup>(11)</sup>; similarmente entre pacientes ingleses verificou-se a recorrência do diabetes mellitus em 11 de 18 pacientes maiores

de 4 anos de idade<sup>(9)</sup>. Esses dados enfatizam a necessidade de seguimento prolongado nesses pacientes.

Além da hiperglicemia o DNT é caracterizado por retardo no crescimento intra-uterino (6,9,11) refletindo o papel importante da insulina no crescimento fetal, especialmente durante o último trimestre da gestação. Ainda, Temple e col observaram macroglossia em 23% dos portadores de DNT e hérnia umbilical em 7% (9). Em comparação com os portadores de DNP, os pacientes com DNT apresentam hiperglicemia em idade mais precoce, menor peso por ocasião do diagnóstico, necessitam de doses menores de insulina para o controle metabólico e apresentam menor freqüência de cetoacidose (11). Entretanto, existe considerável sobreposição das manifestações clínicas entre os dois grupos não permitindo, por ocasião do diagnóstico, inferências se o diabetes será transitório ou permanente.

Anticorpos anti-ilhotas foram negativos nos pacientes testados<sup>(6,9,11)</sup>, indicando uma etiologia não auto-imune na gênese do diabetes.

Os mecanismos que levam a uma falência das células  $\beta$  no período neonatal, seguido de uma recuperação na infância e recorrência na adolescência permanecem incertos, assim como a contribuição relativa da redução no número de células  $\beta$  e diminuição da função dessas células nesse processo. Ma e col desenvolveram uma linhagem de camundongos transgênicos que super-expressam o lócus do DNT humano<sup>(12)</sup>. Verificou-se que intra-útero esses animais apresentavam uma redução na massa de células  $\beta$ . Posteriormente, no período neonatal ocorre uma compensação com aumento no número de células  $\beta$ , entretanto o conteúdo de insulina é menor do que nos animais controle. Uma compensação plena ocorre então nos animais jovens através de um aumento substancial no número das células  $\beta$ ; entretanto esse aumento compensatório não é mantido, ocorrendo a intolerância à glicose na fase adulta. Esses dados indicam que alterações no desenvolvimento pancreático e diminuição da função das células  $\beta$  estão envolvidas na patogênese da doença.

#### 1.2. Diabetes Neonatal Permanente:

DN Permanente é aquele que ocorre nos primeiros meses de vida e, como o nome indica, não entra em remissão. É menos comum do que a forma transitória<sup>(8)</sup>.

No DNP a idade ao diagnóstico é mais tardia do que no DNT, ocorrendo com cerca de 27 dias (intervalo de 1 a 127 dias) $^{(11)}$ . Retardo do crescimento intra-uterino foi observado em 36% dos casos, enquanto no DNT esteve presente em 74% dos afetados. Essas diferenças sugerem que as formas de DN permanente e transitório tenham mecanismos diferentes: um defeito no desenvolvimento e/ou função das células  $\beta$  pode estar presente nos períodos fetal e pós-natal precoce no DNT, enquanto uma falência das células B após o nascimento ocorreria no DNP $^{(11)}$ .

Diabetes mellitus diagnosticado antes dos 6 meses de idade é raramente causado por processo auto-imune. Iafusco e col. demonstraram que em crianças com diabetes diagnosticado antes dos 6 meses 76% apresentavam um genótipo HLA "protetor" para o diabetes mellitus tipo 1 e também menor freqüência de marcadores de auto-imunidade quando comparadas com crianças diagnosticadas após os 6 meses de idade (4). Da mesma forma, Edghill e col. verificaram que em indivíduos com diagnóstico antes dos 6 meses de idade a freqüência dos genótipos HLA de risco para diabetes mellitus tipo 1 foi similar ao da população controle (13). Esses dados indicam que o diabetes mellitus diagnosticado antes dos 6 meses de idade difere do diabetes diagnosticado em idades mais tardias e a maioria desses casos não tem uma etiologia auto-imune.

#### 2. Bases moleculares do DN:

# 2.1. Anomalias no braço longo do cromossomo 6

A maioria (cerca de 70%) dos pacientes com DNT apresenta anormalidades no cromossomo 6q24. Três tipos de anormalidades foram verificados: dissomia uniparental paterna do cromossomo 6 (UPD6) ,ou seja, herança de duas cópias do mesmo cromossomo 6 do pai sem a contribuição materna; duplicação de herança paterna do braço longo do cromossomo 6 e defeitos de metilação (14-18). Apenas se a duplicação for de herança paterna é que ocorre o DNT. As anomalias no cromossomo 6 são devido a alterações de *imprinting*. Em termos simples, *imprinting* consiste na supressão de certos genes através da adição

de grupos metil, geralmente na região promotora, prevenindo a transcrição gênica. Portanto, duas cópias do cromossomo paterno 6, uma duplicação paterna do 6q24 ou perda de *imprinting* (perda de metilação) do 6q24 materno levam a super-expressão do alelo paterno causando o DNT. Dois genes localizados nessa região são candidatos para a doença: o gene que codifica o fator de crescimento *ZAC* que regula o ciclo celular e a apoptose e o gene *HYMAI* de função desconhecida<sup>(19)</sup>. Em um modelo animal que super-expressa o locus DNT humano verificou-se uma redução na expressão do fator de transcrição *IPF-1* no pâncreas desses camundongos<sup>(12)</sup>. O *IPF-1* é um gene envolvido no controle do desenvolvimento pancreático, sendo responsável pelo desenvolvimento coordenado do pâncreas intra-útero e também pela integridade funcional das células β pancreáticas. Não se verificaram diferenças fenotípicas entre os pacientes com UPD6, duplicação do 6q24, defeitos de metilação ou sem anomalias identificadas no cromossomo 6<sup>(9)</sup>.

# 2.2. Mutações no canal de potássio ATP-sensível (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>):

Os canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> são um complexo octamérico composto por quatro subunidades Kir6.2 (*inwardly rectifying potassium channels*) que formam o poro do canal e quatro sub-unidades regulatórias SUR1 (*sulphonylurea receptor*) presentes nas células β pancreáticas. A sub-unidade Kir6.2 é codificada pelo gene *KCNJ11* e a sub-unidade SUR1 pelo gene *ABCC8*, ambos localizados no cromossomo 11 (lócus 11p 15.1). Esses canais têm papel importante na secreção de insulina fazendo a ligação entre o metabolismo celular e a atividade elétrica da membrana plasmática, sendo tanto o Kir6.2 quanto SUR1 vitais para a regulação adequada da secreção de insulina. A glicose entra na célula β através da proteína transportadora GLUT-2, sendo então metabolizada por enzimas da via glicolítica, incluindo a glicoquinase, para produzir ATP. O aumento da relação ATP/ADP intracelular leva ao fechamento do canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> e a despolarização da membrana plasmática. O canal de cálcio voltagemsensível então se abre e o influxo de cálcio resulta em exocitose dos grânulos de insulina.

### 2.2.1. Mutações no gene KCNJ11

Em Abril de 2004 Gloyn e col. descreveram pela primeira vez mutações ativadoras no gene que codifica a sub-unidade Kir6.2 como causa de DNP<sup>(2)</sup>. Desde então, vários estudos reportaram mutações nesse gene e verificou-se ser essa a causa mais comum de DNP, ocorrendo em 31-64% dos casos<sup>(20-22)</sup>. Mutações funcionalmente menos graves resultam em DNT em cerca de 10% dos casos. A maioria dos indivíduos afetados não apresenta história familiar, uma vez que em 90% dos casos as mutações são espontâneas, ocorrendo *de novo*.

As mutações ativadoras no gene *KCNJ11* provocam uma falência no fechamento do K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> na presença de ATP. Isso resulta em um grande influxo de potássio mantendo a membrana plasmática hiperpolarizada, prevenindo assim a secreção de insulina<sup>(23)</sup>.

Nos pacientes afetados, em 75% dos casos, o diagnóstico de diabetes mellitus é feito antes dos 3 meses de idade, em média com 7 semanas<sup>(2)</sup> e apresentam baixo peso ao nascimento refletindo hipoinsulinemia intra-útero. Níveis de peptídeo C são indetectáveis mesmo após estímulo com glucagon<sup>(2, 21)</sup> e 30% dos casos apresentam-se em cetoacidose<sup>(24)</sup>. Além do diabetes mellitus alterações neurológicas estão presentes em cerca de 20% dos pacientes. A forma mais grave consiste em retardo no desenvolvimento, fraqueza muscular e epilepsia, tendo sido proposto o nome de Síndrome DEND (*developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes*)<sup>(25)</sup>. Uma forma mais branda consiste em DN, retardo no desenvolvimento e/ou fraqueza muscular e ausência de epilepsia, sendo referida como Síndrome DEND Intermediária. Os sintomas neurológicos verificados na Síndrome DEND são provavelmente decorrentes de um aumento de atividade dos canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> em outros tecidos além das células β, tais como músculo e/ou nervos<sup>(26)</sup>.

Existem evidências para uma relação fenótipo-genotipo nas mutações do gene *KCNJ11*. Apesar dessa relação não ser absoluta, em geral mutações associadas apenas com DN (permanente ou transitório) localizam-se na região do sítio de ligação do ATP, enquanto mutações que causam alterações neurológicas ocorrem em resíduos mais distantes do sítio de ligação do ATP, sendo principalmente dentro da porção helicoidal<sup>(26)</sup>.

### 2.2.2. Mutações no gene ABCC8:

Como mutações inativadoras nos genes que codificam o Kir6.2 e SUR1 são causa de hipoglicemia hiperinsulinêmica(27) e mutações ativadoras no Kir6.2 causam DN, Proks et al levantaram a hipótese de que mutações ativadoras no SUR1 também seriam causa de DN. De fato, esses pesquisadores identificaram uma mutação ativadora no gene ABCC8 em um paciente com Síndrome DEND<sup>(28)</sup>. Posteriormente, Babenko et al realizaram o rastreamento de mutações nesse gene em pacientes com DN permanente ou transitório e em 12% dos casos mutações foram identificadas, sendo a maioria em DNT<sup>(29)</sup>. Portanto, mutações no gene KCNJ11 são na maioria das vezes associadas com DNP, enquanto mutações no gene ABCC8 são mais frequentemente associadas com DNT. Ainda, verificou-se que em alguns pais dos probandos com mutações no gene ABCC8 e também em portadores da mutação, o diagnóstico do diabetes mellitus foi feito na idade adulta, ou diabetes nem sempre esteve presente nesses adultos carreadores (29,30). Esses dados levaram a proposição de que mutações no gene ABCC8 resultam em forma monogênica de diabetes mellitus não apenas no período neonatal mas com idade de início e penetrância variáveis .

### 2.3. Mutações no gene da insulina:

Recentemente identificaram-se mutações no gene da insulina como causa de DN<sup>(31)</sup>. Há descrições da década de 80 de mutações no gene da insulina atividade biológica da insulina, não mas significantemente sua biossíntese. O desenvolvimento de diabetes mellitus, nesses casos, não foi uniforme ocorrendo apenas na presença de resistência à insulina e na idade adulta, sendo muitos carreadores assintomáticos porém com hiperinsulinemia (32-34). Diferentemente, as mutações identificadas em pacientes com DN são mais graves resultando em diabetes em idade precoce. Em um grande estudo colaborativo internacional identificou-se mutações no gene da insulina em 12% dos pacientes com DNP, sendo a segunda causa mais comum, após mutações no gene KCNJ11, de DNP(35). Os indivíduos afetados apresentaram idade média ao diagnóstico do diabetes melitus de 9 semanas (>90% antes dos 6 meses), em cetoacidose ou hiperglicemia importante (mediana da glicemia ao diagnóstico: 681 mg/dl) e níveis de

peptídeo C indetectáveis ou muito baixos. Verificou-se também baixo peso ao nascimento indicando secreção reduzida de insulina in útero<sup>(31)</sup>.

## 2.4. Mutações no gene da glicoquinase:

A glicoquinase, enzima da via glicolítica, é reguladora do metabolismo da glicose nas células  $\beta$  controlando a secreção de insulina. Mutações em heterozigose no gene da glicoquinase são causa de MODY 2, entretanto quando presentes em homozigose ou heterozigose composta são uma causa bastante rara de DNP. Mutações em homozigose foram descritas inicialmente em dois probandos apresentando-se com DNP no primeiro dia de vida. Os pais apresentavam consangüinidade e intolerância à glicose, sendo heterozigotos para as mesmas mutações presentes nos filhos<sup>(36)</sup>. Apesar de ser uma condição bastante rara, recomenda-se a pesquisa de mutações no gene da glicoquinase em portadores de DNP em que ambos os pais apresentam intolerância à glicose<sup>(3)</sup>.

## 2.5. Mutações no gene IPF-1 (insulin promoter factor 1):

O *IPF-1* é um gene envolvido no controle do desenvolvimento pancreático, sendo responsável pelo desenvolvimento coordenado do pâncreas intra-útero e também pela integridade funcional das células  $\beta$  pancreáticas. Mutações em heterozigose causam MODY 4, enquanto mutações em homozigose ou heterozigose composta foram reportadas em portadores de DNP e agenesia pancreática<sup>(37, 38)</sup>.

#### 2.6. Formas sindrômicas de DN:

Além das condições discutidas acima há ainda doenças multissistêmicas, bastante raras, que incluem DN. Entre essas síndromes inclui-se a Síndrome IPEX (*immunodysregulation polyendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*) que é uma desordem fatal, bastante rara, de herança ligada ao cromossomo X e caracterizada por diarréia intratável com atrofia das vilosidades intestinais, eczema, anemia hemolítica e diabetes mellitus de etiologia auto-imune e hipotiroidismo. Essa síndrome está associada com mutações no gene *FOXP3* que codifica uma proteína denominada scurfina importante para a homeostase imune normal<sup>(39)</sup>. A Síndrome de Wolcott-

Rallison é uma alteração de herança autossômica recessiva caracterizada por diabetes mellitus de início na infância (freqüentemente no período neonatal), displasia espondilo-epifisária, hepatomegalia e insuficiência renal. Está associada com mutações no gene *EIF2AK3*<sup>(40)</sup>. Ainda, diabetes neonatal com hipoplasia pancreática e cerebelar, de herança autossômica recessiva foi associada com mutações no gene *PTF1A*<sup>(41)</sup>. Esse gene está envolvido no desenvolvimento pancreático sendo também expresso no cerebelo.

## 3. Implicações terapêuticas:

Uma vez que as sulfoniluréias, classe de drogas utilizadas no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, causam o fechamento dos canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> por um mecanismo independente do ATP sugere-se que essa droga possa também ser utilizada no DN causado por mutações nos canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>. Em três pacientes com mutações no gene KCNJ11 que apresentavam secreção de insulina mínima em resposta à glicose endovenosa, Gloyn e col. observaram tolbutamida<sup>(2)</sup>. secreção substancial de insulina resposta à em Subsequentemente, reportagens demonstraram a transferência bem sucedida de insulina para sulfoniluréia em muitos dos pacientes portadores de mutações no gene KCNJ11<sup>(21,42,43)</sup>. Em um estudo colaborativo europeu foi possível a substituição de insulina por sulfoniluréia em 90% dos pacientes e em todos houve melhora no controle metabólico. Dentre os pacientes em que não foi possível a suspensão da insulina, 80% apresentavam alterações neurológicas, em contraste com apenas 14% do grupo em que a transferência foi possível<sup>(44)</sup>. As doses necessárias de sulfoniluréia nesses pacientes são mais elevadas do que as usualmente utilizadas para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Pessoalmente tivemos a gratificante experiência da transferência de insulina por glibenclamida em um paciente com Síndrome DEND intermediária devido à mutação G53D no gene KCNJ11 que vinha em uso de insulina há 26 anos<sup>(45)</sup>. Após a transferência houve melhora importante no controle metabólico e de algumas funções neurológicas e desaparecimento dos episódios de hipoglicemia seguidos de crises convulsivas. Resultados similares foram obtidos em pacientes com mutações ativadoras no SUR1<sup>(20,30)</sup>. Portanto, tratamento com sulfoniluréia parece ser seguro, mais eficiente que insulina e deve reduzir o risco de complicações crônicas do diabetes devido a um melhor controle metabólico em portadores de DN causado por mutações ativadoras no canal de  $K^+_{ATP}$  (Gloyn expert opinion). Entretanto, as demais causas de DN devem ser tratadas com insulina.

## 4. Considerações finais:

Apesar do diabetes neonatal ser uma condição rara, a identificação dos defeitos genéticos envolvidos leva ao melhor entendimento das disfunções da célula β, contribuindo assim com as formas mais comuns da doença. Possivelmente os mecanismos moleculares envolvidos no diabetes neonatal também apresentam relevância no diabetes mellitus tipo 2. Ainda, os recentes avanços obtidos na identificação dos mecanismos moleculares do diabetes neonatal demonstram como o conhecimento exato da fisiopatologia pode ter importantes implicações no tratamento desses pacientes.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hattersley AT, Pearson ER. Pharmacogenetics and beyond: the interaction of the therapeutic response, B-cell physiology and genetics in diabetes. Endocrinology 2006; 143:2657-2663.
- 2. Gloyn AL, Pearson ER, Anticliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JMCL, Molnes J, Edghill E, Frayling TM, Temple K, Mackay D, Shield JPH, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JKH, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Aschcroft F, Hattersley AT. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. N Engl J Med 2004; 350:1838-1849.
- Shield JPH. Neonatal diabetes: how research unraveling the genetic puzzle has both widened our understanding of pancreatic development whilst improving children's quality of life. Horm Res 2007; 67:77-83
- 4. Iafusco D, Stazi MA, Cotichini R, Cotellessa M, Martinucci ME, Mazzella M, Cherubini V, Barbetti F, Martinetti M, Cerutti F, and the early onset diabetes study group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. Permanent diabetes in the first year of life. Diabetologia 2002; 45:798-804.
- 5. von Muhlendahl KE, Herkenhoff H. Long-term course of neonatal diabetes. N Engl J Med 1995; 333:704-708.
- Shield JPH, Gardner RJ, Wadswoth EJK, Whiteford ML, James RS, Robinson DO, Baum JD, Temple IK. Aetiopathology and genetic basis of neonatal diabetes. Arch Dis Child 1997; 76: F39-F42.
- 7. Slingerland AS, Hattersley AT. Mutations in the Kir6.2 subunit of the KATP channel and permanent neonatal diabetes: new insights and new treatment. Ann of Medicine 2005; 37:186-195.
- 8. Polak M, Cavé H. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. Orphanet J Rare Dis Mar 2007; 2:12

- Temple IK, Gardner RJ, Mackay DJG, Barber JCK, Robinsons DO, Shield JPH. Transient neonatal diabetes. Widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. Diabetes 2000; 49:1359-1366.
- 10. Schiff D, Cole E, Stern L. Metabolic and growth patterns in transient neonatal diabetes. N Engl J Med 1972; 287:119-122.
- 11.Metz C, Cavé H, Bertrand AM, Deffert C, Gueguen-Giroux B, Czernichow P, Polak M, the NDM French Study Group. Neonatal diabetes mellitus: chromosomal analysis in transient and permanent cases. J Pediatr 2002; 141:483-489.
- 12.Ma D, Shield JPH, Leclerc I, Knauf C, Buecelin R, Rutter GA, Kelsey G. Impaired glucose homeostasis in transgenic mice expressing the human transient neonatal diabetes mellitus locus, TNDM. J Clin Invest 2004; 114:339-348.
- 13. Edghill EL, Dix RJ, Flanaghan SE, Bingley PJ, Hattersley AT, Ellard S, Gillespie KM. HLA genotyping supports a nonautoimmune etiology in patients diagnosed with diabetes under the age of 6 months. Diabetes 2006; 55:1895-1898.
- 14. Temple IK, James RS, Crolla JA, Sitch FL, Jacobs PA, Howell WM, Betts P, Baum JD, Shield JPH. An imprinted gene(s) for diabetes? Nat Genet 1995; 9:110-112.
- 15. Whiteford ML, Narendra A, White MP, Cooke A, Wilkinson AG, Robertson KJ, Tolmie JL. Paternal uniparental disomy for chromosome 6 causes transient neonatal diabetes. J Med Genet 1997; 34:67-168.
- 16. Pivinick EK, Qumisiyech MB, Tharapel AT, Summitt JB, Wilroy RS. Partial duplication of the long arm of chromosome 6: a clinically recognizable syndrome. J Med Genet 1990; 27:523-526.
- 17. Gardner RJ, Mackay DJ, Mungall AJ, Polychronakos C, Siebert R, Shield JP, Temple IK, Robinson DO. An imprinted locus associated with transient neonatal diabetes mellitus. Hum Mol Genet 2000; 9:589-596.

- 18.Temple IK, Gardner RJ, Robinson DO, Kibirige MS, Fergusson AW, Baum JD, Barber JCK, James RS, Shield JPH. Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localized to chromosome 6q22-q23. Hum Mol Genet 1996; 5:1117-1121.
- 19. Arima T, Drewell RA, Arney KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, Surani MA. A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. Hum Mol Genet 2001; 10:1475-1483.
- 20.Massa O, Iafusco D, D'Amato E, Gloyn AL, Hattersley AT, Pasquino B, Tonini G, Dammacco F, Zanette G, Meschi F, Porzio O, Bottazzo G, Crino A, Lorini R, Cerutti F, Vanelli M, Barbetti F and Early Onset Diabetes Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. Hum Mutat 2005; 25:22–27
- 21. Sagen JV, Raeder H, Hathoud E, Shehadeh N, Gudmundsson K, Baevre H, Abuelo D, Phornphutkul C, Molnes J, Bell GI, Gloyn AL, Hattersley AT, Molven A, Sovik O, Njolstad PR. Permanent neonatal diabetes due to mutations in the KCNJ11 encoding Kir6.2. Patient characteristics and initial response to sulphonylurea therapy. Diabetes 2004:53:2713-2718.
- 22. Vaxilaire M, Populaire C, Busiah K, Cavé H, Gloyn AL, Hattersley AT, Czernichow P, Froguel P, Polak M. Kir6.2 mutations are a common cause of permanent neonatal diabetes in a large cohort of French patients. Diabetes 2004; 53:2719-2722.
- 23. Hattersley AT. Molecular genetics goes to the diabetes clinic. Clin Med 2005; 5:476-481.
- 24. Slingerland AS, Hattersley AT. Mutations in the Kir6.2 subunit of the KATP channel and permanent neonatal diabetes: new insights and new treatment. Ann Med 2005; 37:186-195.

- 25. Proks P, Girard C, Haider S, Gloyn AL, Hattersley AT, Sansom SP, Ashcroft FM. A gating mutation at the internal mouth of the Kir6.2 pore is associated with DEND syndrome. EMBO Rep 2005; 6:470-475.
- 26. Hattersley AT, Aschroft FM. Activating mutations in the Kir6.2 and neonatal diabetes. New clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. Diabetes 2005; 54:2503-2513.
- 27. Hussain K. Congenital hyperinsulinism. Semin Fetal Neonatal Med 2005; 10:369-376.
- 28. Proks P, Arnold AL, Bruining J, Girard C, Flanagan SE, Larkin B, Colclough K, Hattersley AT, Aschroft FM, Ellard S. A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. J Hum Mol Genet 2006; 15:1793-1800.
- 29. Babenko AP, Polak M, Cavé H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguillar-Bryan L, Vaxillaire M, Froguel P. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellius. N Engl J Med 2006; 355:456-466.
- 30. Vaxillaire M, Dechaume A, Busiah K, Cavé H, Pereira S, Scharfmann R, Nanclares GP, Castano L, Froguel P, Polak M and the SUR1-Neonatal Diabetes Study Group. New ABCC8 mutations in relapsing neonatal diabetes and clinical features Diabetes 2007; 56:1737-1741.
- 31. Stoy J, Edghill EL, Flanagan SE, Ye Honggang, Paz VP, Pluzhnikov A, Below JE, Hayes MG, Cox NJ, Lipkind GM, Lipton RB, Greeley SAW, Patch AM, Ellard S, Steiner DF, Hattersley AT, Philipson LH, Bell GI for the Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 18:15040-15044
- 32. Shoelson S, Haneda M, Blix P, Nanjo A, Sanke T, Inouye K, Steiner D, Rubenstein A, Tager H. Three mutant insulins in man. Nature 1983; 302:540-543.

- 33. Nanjo K, Sanke T, Miyano M, Okai K, Sowa R, Kondo M, Nishimura S, Iwo K, Miyamura K, Given BD. Diabetes due to secretion of a structurally abnormal insulin (insulin Wakayama). Clinical and functional characteristics of [LeuA3] insulin. J Clin Invest 1986; 77:514-519.
- 34. Nanjo K, Kondo M, Sanke T, Nishi M. Abnormal insulinemia. Diabetes Res Clin Pract 1994; 24 suppl: S135-141.
- 35. Edghill EL, Flanagan SE, Patch AM, Boustred C, Parrish A, Shields B, Shepperd MH, Hussain K, Kapoor RR, Maleck M, Mcdonald MJ, Stoy J, Steiner DF, Philipson LH, Bell GI, the Neonatal Diabetes Internacional Collaborative Group, Hattersley AT, Ellard S. Insulin mutation screening in 1044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabete but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. Diabetes 2007; Dec 27 [Epud ahead of print]
- 36. Njolstad PR, Sagen JV, Cuesta-Munoz A, Bjorkhaug L, MassaO, Barbetti F, Undlien DE, Shiota C, Magnuson MA. Molven A, Matschinsky FM, Bell GI. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. N Engl J Med 2001; 344:1588-1592.
- 37. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WI, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. Nat Genet 1997; 15:106-110.
- 38. Schwitzgebel VM, Mamin A, Brun T, Ritz-Laser B, Zaiko M, Maret A, Jomayvaz FR, Theintz GE, Michielin O, Melloul D, Philipe J. Agenesis of the human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:4398-4406.
- 39. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, poliendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. J Med Genet 2002; 39:537-545.
- 40. Delepine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C. EIF2AK3, encoding translation iniciation factor 2-a kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. Nat Genet 2000; 25:406-409.

- 41. Sellick GS, Barker KT, Scolte-Dijkstra I, Fleischmann C, Coleman RJ, Garrett C, Gloyn AL, Edghill EL, Hattersley AT, Wellaue PK, Goodwin G, Houlston RS. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. Nat Genet 2004; 36:I301-I305.
- 42. Zung A, Glaser B, Nimri R, Zadik Z. Glibenclamide treatment in permanent neonatal diabetes due to an activating mutation in Kir6.2. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:5504-5507.
- 43. Tonini G, Bizzarri C, Bonfanti R, Vanelli M, Cerutti F, Faleschini E, Meschi F, Prisco F, Ciacco E, Cappa M, Torelli C, Cauvin V, Tumini S, Iafusco D, Barbetti F. Sulfonylurea treatment outweights insulin therapy in short-term metabolic control of patients with permanent neonatal diabetes mellitus due to activating mutations of the KCNJ11 (Kir6.2) gene. Diabetologia 2006; 49:2210-2213.
- 44. Pearson ER, Flechtner I, Njolstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, Aschroft FM, Klimes I, Codner E, Iotova, V, Slingerland AS, Shield J, Robert JJ, Holst JJ, Clark PM, Ellard S, Sovik O, Polak M, Hattersley AT, the Neoantal Diabetes International Collaborative Group. Switching from insulin to oral sulfonylreas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. N Engl J Med 2006; 355:467-477.
- 45. Gurgel LC, Crispim F, Noffs MH, Belzunces E, Rahal MA, Moisés RS. Sulfonylrea treatment in permanent neonatal diabetes due to G53D mutation in the KCNJ11 gene: improvement in metabolic control and neurological function. Diabetes Care 2007; 30:e108.
- 46. Gloyn AL, Ellard S. Defining the genetic aetiology of monogenic diabetes can improve treatment. Expert Opin Pharmacother 2006; 7:1759-1767.

# **OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram:

- Pesquisa de mutações nos genes *KCNJ11* e *ABCC8* em portadores de diabetes mellitus com diagnóstico no primeiro ano de vida;
- Reportar a resposta glicêmica e neurológica em um paciente com diabetes mellitus associado à mutação no gene KCNJ11 cujo tratamento foi transferido de insulina para sulfoniluréia.

Pesquisa de Mutações nos Genes *KCNJ11* e *ABCC8* em Portadores de Diabetes Mellitus Diagnosticado no Primeiro Ano de Vida

Lucimary C. Gurgel<sup>1</sup>, Felipe Crispim<sup>1</sup>, Ivaldir S. Dalbosco<sup>2</sup>, Antônio Carlos Pires<sup>3</sup>, Teresa Cristina A. Vieira<sup>1</sup>, Sérgio A Dib<sup>1</sup>, Regina S. Moisés<sup>1</sup>

- 1. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Disciplina de Endocrinologia
- 2. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, RS
- 3. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP

## Endereço para correspondência:

Regina S. Moisés, MD, PhD

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

Rua Botucatu, 740 – 2° andar

04034-970 São Paulo, SP, Brazil,

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

E-mail: rmoises@unifesp.br

## **Abstract**

Activating mutations in the genes encoding for the K<sub>ATP</sub> channel subunits, KCNJ11 and ABCC8, have been shown to be a frequent cause of permanent or transient neonatal diabetes. The aim of this study was to evaluate the contribution of KCNJ11 and ABCC8 genes to diabetes mellitus in patients who were diagnosed within the first year of life. We studied 7 patients (3 females and 4 males, aged 5 to 28 years) with diabetes diagnosed at ages 1 to 8 months. The single exon of KCNJ11 was amplified in three overlapping fragments by PCR. In patients for whom no KCNJ11 abnormality was identified, the 39 exons of ABCC8 were analyzed. PCR products were directly sequenced. We identified four different heterozygous missense mutations in KCNJ11 gene: G53D and R201C in two patients with permanent neonatal diabetes and G53S and G366R in two patients with transient neonatal diabetes, being the G366R a novel mutation. No mutations were found on ABCC8 gene. Three patients carrying KCNJ11 mutations were transferred from insulin to sulfonylurea. In these patients the transfer was successful improving metabolic control, quality of life and some neurological functions in the patient with developmental delay.

In conclusion, the molecular basis for diabetes was identified in the majority of our study population, being *KCNJ11* mutations a common cause of diabetes diagnosed in the first six months of life. The switch from insulin to sulfonylurea in patients with *KCNJ11* mutations is safe and effective, improving their metabolic control and some neurological features.

## Resumo

Mutações ativadoras em heterozigose nos genes que codificam o canal de potássio ATP-sensível, KCNJ11 e ABCC8, são causas frequentes de diabetes neonatal. Essas mutações podem ocasionar o diabetes neonatal permanente ou transitório. O objetivo do presente estudo foi avaliar a contribuição de mutações nos genes KCNJ11 e ABCC8 em nosso meio em pacientes portadores de diabetes mellitus diagnosticado no primeiro ano de vida. Foram avaliados 7 pacientes (3 do sexo feminino e 4 do sexo masculino,com idades entre 5 a 28 anos) e idade ao diagnóstico do diabetes mellitus variando de 1 a 8 meses. Toda região codante do gene KCNJ11 foi amplificada através de PCR utilizando três pares de iniciadores. Análise do gene ABCC8 foi realizada nos pacientes nos quais não se identificou mutações no gene KCNJ11, sendo os 39 exons amplificados através de PCR. Os produtos de PCR foram então diretamente següenciados. Identificamos quatro diferentes mutações missense em heterozigose no gene KCNJ11: G53D e R201C em dois pacientes com diabetes neonatal permanente e G53S e G366R em dois pacientes com diabetes neonatal transitório, sendo a variante G366R ainda não descrita na literatura. Nos demais pacientes, além do estudo molecular no gene KCNJ11 foi feito também o estudo no gene ABCC8, não se identificando variantes. Nos três pacientes nos quais se identificou mutação no gene KCNJ11 foi feita a substituição de insulina por sulfoniluréia, tendo sido bem sucedida em todos os casos. Nesses pacientes houve melhora importante do controle metabólico, melhora da qualidade de vida e melhora em algumas funções neurológicas no também paciente que além do diabetes apresentava retardo do desenvolvimento neuro-psicomotor.

Em conclusão, identificamos a etiologia do diabetes neonatal na maioria dos pacientes estudados, sendo mutações no gene *KCNJ11* uma causa freqüente para esse tipo de diabetes. A substituição de insulinoterapia por sulfoniluréia nos casos em que se identificou mutação no gene KCNJ11 é segura e eficaz, promovendo melhora no controle metabólico e em algumas funções neurológicas.

## Introdução

Diabetes mellitus neonatal (DN) é definido como hiperglicemia que necessita do uso de insulina, sendo usualmente diagnosticado dentro dos três primeiros meses de vida<sup>(1,2)</sup>. Entretanto, recentes estudos indicam que possivelmente todos os casos de diabetes mellitus diagnosticado nos seis primeiros meses de vida devam ser resultantes de formas monogênicas da doença, uma vez que marcadores de auto-imunidade associados ao diabetes mellitus tipo 1 são raros nesse grupo etário<sup>(3,4)</sup>. Em vista disso, tem-se proposto que essa definição seja mudada para os casos de diabetes diagnosticado nos primeiros seis meses de vida<sup>(5)</sup>. Em cerca de 50% dos casos ocorre resolução espontânea do quadro dentro de um período médio de 3 meses sendo, portanto denominado DN transitório. Na outra metade dos casos o tratamento é continuamente necessário, sendo o DN permanente<sup>(1,2)</sup>. Nos casos de diabetes neonatal transitório em torno de 50% dos casos ocorre recidiva da doença na infância ou adolescência<sup>(6)</sup>.

É uma doença rara com uma incidência de 1 em 400.000 a 500.000 nascidos vivos<sup>(7)</sup>.

Recentemente identificou-se que mutações ativadoras em heterozigose nos genes que codificam o canal de potássio ATP-sensível (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>) são causas freqüentes de DN<sup>(8)</sup>. O K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> é um complexo octamérico composto por quatro subunidades Kir 6.2 e quatro sub-unidades regulatórias SUR1. A sub-unidade Kir6.2 é codificada pelo gene *KCNJ11* e a sub-unidade SUR1 pelo gene *ABCC8*, ambos localizados no cromossomo 11 (locus 11p 15.1). Esses canais têm um papel crítico na secreção de insulina, fazendo a ligação entre o metabolismo celular e a atividade elétrica da membrana plasmática<sup>(9)</sup>. Mutações no gene *KCNJ11* ocorrem em 30 a 64% dos casos de DN permanente, podendo também mutações funcionalmente menos graves ser causa de DN transitório<sup>(2)</sup>. Já mutações no gene *ABCC8* são responsáveis por uma menor freqüência de DN, cerca de 12% dos casos, sendo na maioria das vezes DN transitório<sup>(10,11)</sup>.

Na maioria das vezes os indivíduos afetados por mutações ativadoras nos genes que codificam os K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> apresentam-se com o quadro de DN isolado.

Porém, em cerca de 20% dos casos anormalidades neurológicas tais como retardo do desenvolvimento, fraqueza muscular e epilepsia estão associadas, tendo sido proposto o nome de Síndrome DEND (de developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes) para essa condição (12). A alta afinidade das sulfoniluréias aos canais de K<sup>+</sup>ATP indicava que essas drogas poderiam ser utilizadas em substituição à insulina em pacientes com mutações nos genes que codificam esses canais. De fato, verificou-se que muitos pacientes com mutações nos canais  $K^{+}_{ATP}$ respondem bem ao tratamento com sulfoniluréias (13-15).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a contribuição de mutações nos genes *KCNJ11* e *ABCC8* em nosso meio em pacientes portadores de diabetes mellitus diagnosticado no primeiro ano de vida.

#### Pacientes e Métodos:

Foram avaliados 7 pacientes (3 do sexo feminino e 4 do sexo masculino) com idades variando de 5 a 28 anos portadores de diabetes mellitus diagnosticado no primeiro ano de vida. A idade ao diagnóstico do diabetes mellitus variou de 1 a 8 meses. Os pacientes selecionados foram submetidos à anamnese e exame físico completo.

## **Análise Molecular:**

DNA total foi extraído de leucócitos de sangue periférico utilizando um kit comercial (Puregene DNA Isolation Kit, Gentra System, Minneapolis, MN, USA). Toda região codante do gene *KCNJ11* foi amplificada através de PCR utilizando três pares de iniciadores. Análise do gene *ABCC8* foi realizada nos pacientes nos quais não se identificou mutações no gene *KCNJ11*, sendo os 39 exons amplificados através de PCR. Para os dois genes o sequenciamento foi realizado em ambas as direções utilizando o kit Big Dye Terminator Cycler Sequencing (Applied Biosystem, CA, USA) e as reações foram analisadas utilizando o equipamento ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüência de número NM\_000525 do GenBank para o gene *KCNJ11* e com a seqüência de número NM\_000352 do GenBank para o gene *ABCC8*.

#### Análise Estatística:

As variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  DP e as variáveis categóricas foram expressas como número de casos. Para comparação das médias entre as variáveis contínuas foi utilizado o teste t. O teste do  $\chi^2$  foi utilizado para avaliar as diferenças entre as variáveis categóricas.

#### Resultados:

Apresentamos na Tabela 1 as características da população estudada. Por ocasião da investigação os pacientes não apresentavam evidência de autoimunidade contra células β pancreáticas (anticorpos anti-GAD negativos). A idade ao diagnóstico do diabetes variou de 1 a 8 meses, sendo que apenas em dois indivíduos o diagnóstico foi após o 6º mês de idade. Dois dos pacientes estudados (P3 e P4) apresentaram diabetes neonatal transitório. O paciente P3 teve o diagnóstico de diabetes mellitus aos 3 meses de idade, sendo então instituído o tratamento com insulinoterapia. Após 3 meses houve remissão do quadro e desde então apresenta hiperglicemia apenas em situações de estresse infeccioso. A paciente P4 desenvolveu diabetes mellitus aos 3 meses de idade, sendo instituído o tratamento com insulina. Aos 5 anos houve remissão do quadro que perdurou até os 11 anos de idade.

Em relação ao peso ao nascimento verifica-se que dois pacientes apresentaram baixo peso ao nascimento (≤ 2500 g), dois pacientes peso insuficiente (>2500 e < 3000g) e dois peso adequado (≥ 3000 g). Em uma paciente o peso ao nascimento é desconhecido. Dois pacientes (P1 e P6) apresentaram retardo importante do desenvolvimento neuro-psico motor e crises convulsivas. No paciente P1 foi realizada uma bateria de testes neuropsicológicos e verificou-se baixo nível intelectual (QI: 52) e rebaixamento global das funções cognitivas. Em nenhum dos pacientes estudados verificou-se características dismórficas faciais tais como fronte olímpica, macroglossia ou queda da rima bucal.

## Estudo molecular:

A base molecular para o diabetes neonatal foi identificada em 4 dos 7 pacientes, todos com diagnóstico nos seis primeiros meses de vida.

Identificamos quatro mutações diferentes em heterozigose no gene *KCNJ11*: G53D (paciente P1), R201C (paciente P2), G53S (paciente P3) e G366R (paciente P4). Nos pacientes nos quais não se identificou mutação no gene *KCNJ11* foi feito o estudo molecular do gene *ABCC8* e também não se identificou nenhuma variante. Apresentamos na figura 1 o heredograma das famílias estudadas.

Das mutações identificadas no gene *KCNJ11*, três delas já foram previamente reportadas<sup>(1,16,17)</sup>, enquanto a mutação G366R é nova. Em três indivíduos nos quais se identificou mutação, ambos os pais foram testados e a transmissão familiar foi observada apenas na paciente P4. Nessa paciente que apresentou diabetes neonatal transitório a mutação foi identificada em seu pai e três irmãos. O pai teve o diagnóstico de diabetes feito por ocasião da presente investigação. Irmã, atualmente com 33 anos de idade, teve o diagnóstico de diabetes aos 13 anos de idade. Nos dois outros irmãos carreadores da mutação verificou-se tolerância à glicose normal em um deles e glicemia de jejum alterada em outro.

Comparando-se os pacientes com mutação no gene KCNJ11 e os pacientes com etiologia desconhecida do diabetes não verificamos diferenças significantes em suas características clínicas (Tabela 2). Todos os pacientes foram tratados com insulina imediatamente após o diagnóstico de diabetes. Nos três pacientes nos quais se identificou mutação no gene *KCNJ11* (pacientes P1, P2 e P4) foi feita a tentativa de substituição de insulina por sulfoniluréia, tendo sido bem sucedida em todos os casos. Houve melhora importante do controle metabólico, melhora da qualidade de vida e no paciente P1 melhora nas funções neurológicas particularmente nas funções verbais, na memória e no nível de atenção. Detalhes da transferência e benefícios clínicos obtidos no paciente P1 foram reportados previamente<sup>(14)</sup>.

## Discussão

No presente estudo identificamos o defeito molecular em 57% dos pacientes com diabetes diagnosticado no primeiro ano de vida, sendo que em um deles uma variante ainda não descrita no gene *KCNJ11* foi verificada. Entretanto, se considerarmos apenas os pacientes em que o diagnóstico de

diabetes foi feito até o 6º mês de vida, em apenas um deles (P7) não identificamos a causa genética do diabetes. Estudos anteriores em populações caucasianas reportaram porcentagens semelhantes de pacientes portadores de diabetes neonatal devido a mutações no gene *KCNJ11*<sup>(1,15)</sup>.

Em nossa casuística, identificamos uma mutação (G366R) ainda não descrita na literatura. A paciente carreadora dessa variante apresentou uma forma transitória de diabetes neonatal com recidiva aos 11 anos de idade. Essa mutação foi herdada de seu pai, cujo diagnóstico de diabetes mellitus foi feito por ocasião da presente investigação. Além do probando três outros irmãos são carreadores da mutação, sendo que um deles apresenta tolerância normal à glicose. É bastante provável que a mutação G366R seja patogênica uma vez que o resíduo glicina no códon 366 é conservado entre diferentes espécies tais como camundongo, cachorro, cavalo, macaco, sugerindo ser crítico para a função do canal de potássio. Entretanto, apenas estudos funcionais indicarão a patogenicidade dessa mutação. Verificamos que a mãe e um irmão da paciente P4 apesar de apresentarem diagnóstico de DM não eram portadores da mutação encontrada nos outros familiares e assim, provavelmente, devem apresentar uma causa diferente para o DM. A co-segregação não completa de diferentes mutações com o diabetes já foi reportada previamente não excluindo, portanto seu papel etiológico<sup>(8)</sup>. Ainda, o fenótipo variável observado na família por nós estudada onde os carreadores da mutação apresentaram o diagnóstico de diabetes em diferentes faixas etárias também foi previamente observado<sup>(8,18)</sup>, não sendo claro porque uma determinada mutação causa um fenótipo variável<sup>(19)</sup> não apenas em relação à idade de diagnóstico, mas também na severidade da deficiência de insulina.

Nos pacientes estudados quando não identificamos variantes no gene *KCNJ11* procedemos ao estudo molecular do gene *ABCC8*, onde nenhuma variante foi verificada. Um Estudo anterior identificou mutações no gene ABCC8 em cerca de 12% dos pacientes com diabetes neonatal, sendo na maioria dos casos diabetes neonatal transitório, em todos com diagnóstico do diabetes feito antes dos 6 meses de idade<sup>(11)</sup>. Possivelmente, o pequeno número de pacientes por nós estudados não permitiu o encontro de mutações no gene *ABCC8*.

Recentemente identificaram-se mutações no gene da insulina como uma importante causa de diabetes neonatal permanente<sup>(20,4)</sup>. Clinicamente os pacientes com mutações no gene da insulina apresentam semelhanças com os portadores de mutações nos gene *KCNJ11* ou *ABCC8*, exceto que geralmente são mais velhos por ocasião do diagnóstico do diabetes<sup>(20)</sup>. Ainda, verificou-se que a idade de início do diabetes pode apresentar variações entre os familiares afetados e penetrância variável é comum não apenas entre diferentes famílias, mas também entre familiares com a mesma mutação<sup>(4)</sup>. Estudos posteriores indicarão se algum dos pacientes em que não identificamos mutações nos genes *KCNJ11* ou *ABCC8* apresenta mutações no gene *INS*.

Estudos anteriores mostram que a maioria dos portadores de diabetes neonatal associado a mutações nos genes que codificam o K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> apresentam diabetes isolado, porém em cerca de 20-30% dos casos anormalidades neurológicas podem também estar presentes<sup>(21)</sup>. Essas manifestações extrapancreáticas são decorrentes de hiperatividade do K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> em músculo, nervos periféricos e cérebro<sup>(21)</sup>. Em nossa casuística identificamos dois pacientes (P1 e P6) que apresentavam retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor e crises convulsivas. Interessantemente, na paciente P6 não foram identificadas mutações nos genes KCNJ11 ou ABCC8. Já no paciente P1 identificamos a mutação G53D no gene KCNJ11 e, além da melhora no controle metabólico, a substituição da insulina por glibenclamida promoveu também melhora em seu quadro neurológico<sup>(14)</sup>. Há poucos relatos de melhora nas anormalidades neurológicas em pacientes tratados com sulfoniluréias (22,23), sendo que em pacientes adultos há apenas a nossa experiência e a de Koster et al em um indivíduo com a mesma mutação G53D<sup>(17)</sup>. Mutações no resíduo G53 levam a redução na sensibilidade ao ATP<sup>(24)</sup>, sendo algumas associadas com formas mais graves da doença (G53D), enquanto outras (G53R, G53S) com formas mais brandas. De fato, em nossa casuística identificamos a mutação G53D em um paciente com diabetes neonatal permanente e alterações neurológicas, enquanto a mutação G53S foi identificada em um paciente com diabetes neonatal transitório sem outras manifestações extra-pancreáticas.

Na maioria dos casos de DN permanente as mutações nos genes que codificam o K<sup>+</sup>ATP ocorrem espontaneamente (mutações *de novo*)<sup>(1,21)</sup>,

enquanto no DN transitório as mutações *de novo* ocorrem em apenas 28% dos casos<sup>(8)</sup>. Esses dados estão em concordância com nossos achados onde em apenas uma paciente com DN transitório (P6) houve herança paterna da mutação; enquanto nos demais indivíduos as mutações ocorreram *de novo*.

Em conclusão, identificamos a etiologia do diabetes neonatal na maioria dos pacientes estudados, sendo mutações no gene *KCNJ11* uma causa freqüente para esse tipo de diabetes. A substituição de insulinoterapia por sulfoniluréia nos casos em que se identificou mutação no gene KCNJ11 é segura e eficaz, promovendo melhora no controle metabólico e em algumas funções neurológicas. Portanto, recomenda-se o estudo molecular em pacientes com diabetes mellitus cujo diagnóstico foi feito no primeiro ano de vida, pois a identificação da mutação tem implicações no prognóstico e na terapia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JM, Molnes J, Edghil EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JP, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JK, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Aschcroft FM, Hattersley AT. Activating mutations in the gene encoding the ATPsensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. N Engl J Med 2004; 350:1838-1849.
- Gloyn AL, Reimann F, Girard C, Edghill EL, Proks P, Pearson ER, Temple K, Mackay DJG, Shield JPH, Freedenberg D, Noyes K, Ellard S, Aschcroft FM, Gribble FM, Hattersley AT. Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in the KCNJ11. Hum Mol Genet 2005; 14: 925-934.
- Iafusco D, Stazi MA, Cotichini R, Cotellessa M, Martinucci ME, Mazzella M, Cherubini V, Barbetti F, Martinetti M, Cerutti F, and the early onset diabetes study group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. Permanent diabetes in the first year of life. Diabetologia 2002; 45:798-804.
- 4. Edghill EL, Flanagan SE, Patch AM, Boustred C, Parrish A, Shields B, Shepperd MH, Hussain K, Kapoor RR, Maleck M, Mcdonald MJ, Stoy J, Steiner DF, Philipson LH, Bell GI, the Neonatal Diabetes Internacional Collaborative Group, Hattersley AT, Ellard S. Insulin mutation screening in 1044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. Diabetes 2007; 57(4):1034-42
- 5. Shield JPH. Neonatal diabetes: how research unraveling the genetic puzzle has both widened our understanding of pancreatic development whilst improving children's quality of life. Horm Res 2007; 67:77-83

- Temple IK, Gardner RJ, Mackay DJ, Barber JC, Robinson DO, Shield JP. Transient neonatal diabetes: widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. Diabetes 49:1359 –1366, 2000
- Jeha GS, Venkatesh MP, Edelen RC, Kienstra KA, Karaviti L, Fernandes CJ. Neonatal Diabetes Mellitus: Patients Reports and Review of Current Knowledge and Clinical Practice. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism 2005; 18: 1095-1102.
- Flanagan SE, Patch AM, Mackay DJG, Edghil EL, Gloyn AL, Robinson D, Shield J.P.H., Ellard S, Hattersley AT. Mutations in ATP-Sensitive K+ Channel Genes Cause Transient Neonatal Diabetes and Permanent Diabetes in Childhood or Adulthood. Diabetes 2007; 56: 1930-1937
- Clement JP 4th, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. Neuron 1997; 18(5):827-38
- 10.Proks P, Arnold AL, Bruining J, Girard C, Flanagan SE, Larkin B, Colclough K, Hattersley AT, Aschroft FM, Ellard S. A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. J Hum Mol Genet 2006; 15:1793-1800.
- 11. Babenko AP, Polak M, Cavé H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Vaxilaire M, Froguel P and the SUR1-Neonatal Diabetes Study Group. Activating Mutations in The ABCC8 Gene in Neonatal Diabetes Mellitus. N Engl J Med 2006; 355:456-465.
- 12. Proks P, Girard C, Haider S, Gloyn AL, Hattersley AT, Sansom SP, Ashcroft FM. A gating mutation at the internal mouth of the Kir6.2 pore is associated with DEND syndrome. EMBO Rep 2005; 6:470-475.
- 13. Pearson ER, Flechtner I, NjØlstad PR et al. Switching from Insulin to Oral Sulfonylureas in Patients with Diabetes Due to Kir6.2 Mutations. N Engl J Med 2006;355: 467-477

- 14. Gurgel LC, Crispim F, Noffs MH, Belzunces E, Rahal MA, Moisés RS. Sulfonylrea treatment in permanent neonatal diabetes due to G53D mutation in the KCNJ11 gene: improvement in metabolic control and neurological function. Diabetes Care 2007; 30:e108.
- 15. Malecki MT, Skupien J, Klupa T, Wanic K, Mlynarski W, Gach A, Solecka I, Sieradzki J. Transfer to Sulfonylureas Therapy in Adult Subjects With Permanent Neonatal Diabetes Due to KCNJ11-Activating Mutations. Diabetes Care 2007; 30: 147-149.
- 16. Flanagan SE, Edghil EL, Gloyn AL, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in KCNJ11, wich encodes Kir6.2, are a common cause of diabetes diagnosed in the first 6 months of life, with the phenotype determined by genotype. Diabetologia 2006; 49: 1190-1197.
- 17. Koster JC, Cadario F, Peruzzi C, Colombo C, NicholsCG, Barbetti F. The G53D Mutation in Kir6.2 (KCNJ11) is associated with neonatal diabetes and motor dysfunction in adulthood that is improved with sulfonylurea therapy. J Clin Endocrin Metab 2007; 93(3):1054-61.
- 18. Støy J, Greeley SAW, Paz VP, Ye H, Pastore AN, Skowron KB, Lipton RB, Cogene FR, Bell GI, and Philipsona LH. Diagnosis and treatment of neonatal diabetes: an United States experience. Pediatr Diabetes. 2008; 9(5): 450–459.
- 19. Klupa T, Edghill EL, nazim J, Sieadzki J, Ellard S, Hattersley AT, Malecki MT. The identification of a R201H mutation in KCNJ11, which encodes Kir 6.2, and successful transfer to sustained-release sulphonylurea therapy in a subject with neonatal diabetes: evidence for heterogeneity of beta cell functionamong carriers of the R201H mutation. Diabetologia 2005; 48(5):1029-31.
- 20. Stoy J, Edghill EL, Flanagan SE, Ye Honggang, Paz VP, Pluzhnikov A, Below JE, Hayes MG, Cox NJ, Lipkind GM, Lipton RB, Greeley SAW, Patch AM, Ellard S, Steiner DF, Hattersley AT, Philipson LH, Bell GI for the Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Insulin gene

- mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 18:15040-15044.
- 21. Slingerland AS, Hattersley AT. Mutations in the Kir6.2 subunit of the KATP channel and permanent neonatal diabetes: new insights and new treatment. Ann Med 2005;37:
- 22. Slingerland AS, Nuboer R, Hadders-Algra M, Hattersley AT, Bruining GJ. Improved motor developmental and good long-term glycaemic control with sulfonylurea treatment in a patient with the syndrome of intermediate developmental delay, early-onset generalized epilepsy and neonatal diabetes associated with the V59M mutation in the KCNJ11 gene. Diabetologia 2006; 49(11):2559-63.
- 23. Slingerland AS, Hurkx W, Noordam K, Flanagan SE, Jukema JW, Meiners LC, Bruining GJ, Hattersley AT, Hadders-Algra M. Sulphonylurea therapy improves cognition in a patient with the V59M KCNJ11 mutation. Diabet Med. 2008; 25(3):277-81.
- 24. Koster JC, Kurata HT, Enkvetchakul D, Nichols CG. DEND mutation in Kir6.2 (KCNJ11) reveals a flexible N-terminal region critical for ATP-sensing of the KATP channel. Biophys J. 2008; 95(10):4689-97.

Tabela 1 – Características da população estudada

Identificação	Sexo (M/F)	Idade atual (anos)	Idade ao diagnóstico do DM (meses)	Peso ao	Alterações
				nascimento(g)	Neurológicas
P1	М	28	3	2700	Retardo do
					desenvolvimento
					Crises convulsivas
P2	M	5	2	1540	ausentes
P3	М	7	3	3660	ausentes
P4	F	23	3	2700	ausentes
P5	F	6	7	3049	ausentes
P6	F	15	8	desconhecido	Retardo do
					desenvolvimento
					Crises convulsivas
P7	М	19	1	1770	ausentes

Tabela 2 – Características clínicas dos probandos com DM neonatal de etiologia desconhecida e pacientes com mutação no gene *KCNJ11* 

	Etiologia desconhecida	Mutação KCNJ11	р
n	3	4	-
Idade ao diagnóstico DM	5,33±3,8	2,75±0,5	0,22
(meses)			
Peso ao nascimento (g)	2409,5±904,4	3020±554,3	0,40
Alterações neurológicas	1/2	1/3	1,0
(sim/não)			
Remissão DM (sim/não)	0/3	2/2	0,42

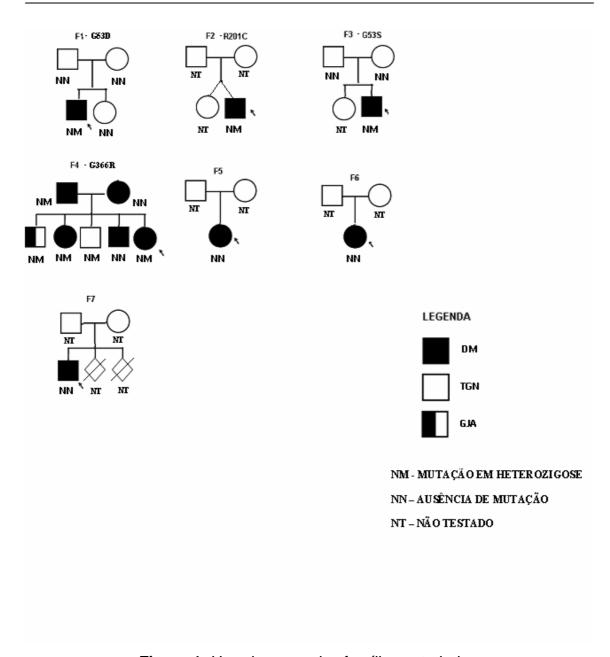


Figura 1: Heredograma das famílias estudadas

## Sulfonylrea Treatment in Permanent Neonatal Diabetes Due to G53D Mutation in the *KCNJ11* Gene

Improvement in glycemic control and neurological function

Lucimary C. Gurgel, MD<sup>1</sup>, Felipe Crispim, BSC<sup>1</sup>, Maria Helena S. Noffs, MSC<sup>2</sup>, Erich Belzunces, BSC<sup>2</sup>, Márcio A. Rahal, MD<sup>2</sup>, Regina S. Moisés, MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Endocrinology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Department of Neurology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Address correspondence to Regina S. Moisés, MD, PhD Universidade Federal de São Paulo Rua Botucatu, 740-2° Andar, 04034-970 São Paulo, Br azil. E-mail: rmoises@endocrino.epm.br.

Publicado em: Diabetes Care 30 (11): e108, 2007

Previous studies have reported the successful switch from insulin to sulfonylrea therapy in some patients who have neonatal diabetes due to *KCNJ11* mutations<sup>(1)</sup>; however, data on adults are limited<sup>(2,3)</sup>. Also, it has not yet been determined whether neurological symptoms can be improved by the action of sulfonylrea therapy. Here, we report the glycemic and neurological responses in an adult patient with the G53D mutation in the *KCNJ11* gene who was transferred from insulin to sulfonylurea.

A 26-year-old male patient was diagnosed with diabetes in the third month of life, and insulin treatment was initiated. Islet cell antibodies were negative. He showed severe learning difficulties and very poor attention. Crisis of generalized seizures started at age 5 years during episodes of hypoglycemia; his electroencephalogram was normal.

In 2006, the proband was found to have a heterozygous G53D mutation in the KCNJ11 gene. In an attempt to switch from insulin to sulfonylrea therapy, glibenclamide was introduced. After 4 weeks, the patient no longer required insulin and was using 0.8 mg . kg<sup>-1</sup> . day<sup>-1</sup> glibenclamide; subsequently, the dose was reduced to 0.68 mg . kg<sup>-1</sup> .day<sup>-1</sup>. Capillary glucose measurements showed that 3 months after starting glibenclamide therapy, mean glucose levels before lunch and dinner reduced from 185  $\pm$ 100 to 107  $\pm$  45 mg/dl (P = 0.036) and from 225  $\pm$  110 to 111  $\pm$  41 mg/dl (P = 0.006), respectively. A 72-h continuous glucose monitoring showed that 76% of glycemic values were between 71 and 199 mg/dl. Postprandial C peptide level was 0.05 ng/ml before sulfonylrea therapy and increased to 1.3 ng/ml during glibenclamide treatment. The patient was given an identical battery of neuropsychological tests before and after initiating sulfonylrea therapy. At baseline, the patient showed low intellectual level (IQ: 52) and global impairment on cognitive functions. Retesting 3 months after initiating glibenclamide showed an important improvement in verbal performance, such as episodic verbal memory, visual naming ability, verbal learning, and long-term memory.

Here, we showed the effectiveness of sulfonylrea therapy in an adult patient carrying the G53D mutation in the *KCNJ11* gene. The change to sulfonylrea resulted in a marked improvement in diabetes control and quality of life. Also, an improvement on verbal performance was observed. It is very likely that the

improvement observed in our patients' neurological status is related to the action of glibenclamide on sulfonylrea receptor 1 present in the neurons. However, we cannot exclude the possibility that the reduction of hypoglycemia may also have contributed.

In summary, this case illustrates that sulfonylrea treatment can be effective even in adult patients with neonatal diabetes due to *KCNJ11* mutations. Besides improvements on metabolic control and quality of life, sulfonylrea therapy also showed beneficial effect on neurological functions.

#### References

- Pearson ER, Flechtner I, Njostad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, Aschcroft FM, Klimes I, Codner E, Iotova V, Slingerland AS, Shield J, Robert JJ, Holst JJ, Clark PM, Ellard S, Sovik O, Pollak M, Hattersley AT, Neonatal Diabetes International Collaborative Group: Switching from insulin to oral sulfonilureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutation. N Engl J Med 355:467–477, 2006
- Colombo C, Delvecchio M, Zecchino C, Faienza MF, Cavallo L, Barbetti F, the Early Onset Diabetes Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology: Transient neonatal diabetes is associated with a recurrent (R201H) KCNJ11 (KIR6.2) mutation. Diabetologia 48:2439–2441, 2005
- Malecki MT, Snupien J, Klupa T, Wanic K, Mlynarski W, Gach A, Solecka I, Sieradzki J: Transfer to sulphonylrea therapy in adult subjects with permanent neonatal diabetes due to KCNJ11-activating mutations: evidence for improvement in insulin sensitivity. Diabetes Care 30:147–149,2007

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No **artigo 1** fizemos uma revisão da literatura sobre diabetes neonatal onde conceitos atuais são apresentados e onde discutimos as características clínicas do DN, os mecanismos moleculares envolvidos e suas implicações terapêuticas. Dentre as diferentes etiologias do DN, foi evidenciado que mutações ativadoras em heterozigose no gene *KCNJ11*, que codifica a sub-unidade Kir6.2 do canal de potássio ATP-sensível, são a causa mais comum de DN permanente. Apesar do diabetes neonatal ser uma condição rara, a identificação dos defeitos genéticos envolvidos leva ao melhor entendimento das disfunções da célula β. Ainda, os recentes avanços obtidos na identificação dos mecanismos moleculares do diabetes neonatal demonstram como o conhecimento exato da fisiopatologia pode ter importantes implicações no tratamento desses pacientes.

No artigo 2 foi feito o estudo genético em portadores de diabetes mellitus com diagnóstico no primeiro ano de vida. Nesse estudo identificamos a etiologia do diabetes neonatal na maioria dos pacientes estudados (57%), porém se considerarmos apenas os pacientes em que o diagnóstico de diabetes foi feito até o 6º mês de vida, em apenas uma família (F7) não identificamos a causa genética do diabetes. Nossos dados mostram que, similar ao verificado em estudos anteriores, o gene KCNJ11 é um dos principais genes envolvidos no diabetes neonatal diagnosticado no primeiro ano de vida. Estudos anteriores identificaram mutações no gene ABCC8 em cerca de 12% dos pacientes com diabetes neonatal, sendo na maioria dos casos diabetes neonatal transitório, em todos com diagnóstico do diabetes feito antes dos 6 meses de idade. Não verificamos, entretanto, nenhuma variante no gene ABCC8, mesmo nos pacientes com diabetes neonatal transitório, possivelmente devido o pequeno número de pacientes por nós estudado. Recentemente mutações no gene INS têm sido apontadas como uma importante causa de diabetes neonatal permanente. Uma investigação futura indicará se algum dos pacientes, em que não identificamos mutações nos genes KCNJ11 ou ABCC8, apresenta mutações no gene INS.

No **artigo 3** apresentamos nossa experiência com a transferência de insulina para sulfoniluréia em um paciente com diabetes diagnosticado no 3°. mês de vida carreador da variante G53D no gene *KCNJ11*. Verificamos que a substituição de insulinoterapia por sulfoniluréia é segura e eficaz mesmo em paciente adulto e com alterações neurológicas. Observamos que o tratamento com sulfoniluréia resultou em melhora no controle metabólico e propiciou também a melhora de algumas funções neurológicas.

## **CONCLUSÕES**

Os dados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Na população estudada foi possível a identificação da etiologia genética na maioria dos indivíduos, sendo mutações no gene KCNJ11 a causa mais frequente de diabetes diagnosticado no primeiro ano de vida.
- A substituição de insulina por sulfoniluréia nos casos em que se identificou mutação no gene KCNJ11 é segura, promovendo melhora no controle metabólico e em algumas funções neurológicas;
- Portanto, recomenda-se o estudo molecular em pacientes com diabetes mellitus cujo diagnóstico foi feito no primeiro ano de vida, pois a identificação da mutação tem implicações no prognóstico e na terapia.

## **ANEXOS**

## INICIADORES UTILIZADOS PARA SEQUENCIAMENTO DO GENE KCNJ11

O exon 1 foi dividido em 3 regiões:

## Região 1:

FORWARD ctc aga agt gag gcc agc a

REVERSE ctg atc ctc atc gtg cag aa

## Região 2:

FORWARD cac cag cat cca ctc ctt ct

REVERSE atc atc gtc atc ctg gaa gg

## Região 3:

FORWARD ccg ctg atc atc tac cat gt

REVERSE cta ttt ctg gcc tca gca gg

# INICIADORES UTILIZADOS PARA SEQUENCIAMENTO DO GENE *ABCC8*EXON 1

FORWARD cag ctg agc ccg agc cca g

REVERSE tcc tcc ctc cct gct ctc ccg tc

## **EXON 2**

FORWARD ttt gtg tgt acc agc ctt gg

REVERSE tag gat ctc ctt ggg cct tt

## **EXON 3**

FORWARD ggc ctc cag atc ata tac cc

REVERSE gcc tgt cta tcc tcc ttc acc

## **EXON 4**

FORWARD cgt gca cat cca ctt act cg

REVERSE ggg cca gat gca gtg tct at

## **EXON 5**

FORWARD tca agt gtg gaa tat cac aac c

REVERSE cca act gtg cct gtc cta tg

## **EXON 6**

FORWARD cca gac aac agg agc tag gg

REVERSE ctc aca cac att ggc ctg tt

## **EXON 7**

FORWARD caa gcc cag agg gtc ttg ta

REVERSE ttg agt gtc cat gag gat gaa

## **EXON 8**

FORWARD gta aca ggt ggc atc tgg tgt

REVERSE aaa ggt aca ggc aag cat gg

## **EXON 9**

FORWARD cca agg ctt gtc cca ctc ta

REVERSE atg aca gtg tgg gtg tgt gg

## **EXON 10**

FORWARD ctg gga aat gga gtc aat gg

REVERSE gct atc aga gcc agt ttg agg

## **EXON 11**

FORWARD ccc tag cct act gga gct gt

REVERSE cta agc ctc cgg tct tcc a

**EXON 12** 

FORWARD ggg atg atg aag gtg tct cc

REVERSE atg tcc ctc tga cca acc ag

**EXONS 13 e 14** 

FORWARD tat cag gct gcg ccc tct

REVERSE agc ttt ctg gct ttc cag gt

**EXON 15** 

FORWARD ggg ctg gaa tca gtg tct tt

REVERSE ata ccc agg gca tac acc aa

**EXON 16** 

FORWARD gag cca gag gag gat gtt ga

REVERSE ggc cct cca ata aat gtg tg

**EXON 17** 

FORWARD gtg gga ggg aca gag att ga

REVERSE tgc aca tcc ctg aat cca ta

**EXON 18** 

FORWARD tct atg cag cat ttg tgg cta

REVERSE atg cac aga aac agc agc ag

**EXON 19** 

FORWARD acc cag acc tct caa acc tg

REVERSE cct atg gga gct gga ttg c

**EXON 20** 

FORWARD ttg ttc cca acc aat tcc at

REVERSE gca act ctt cag cct tca atg

**EXON 21** 

FORWARD agg tga gaa gca ggc aaa ga

REVERSE atc tct ggc agg agg gat tt

**EXON 22** 

FORWARD tga gtt gtc caa agc cac ac

REVERSE aga caa cgg att ggt tcc tg

**EXON 23** 

FORWARD atc aat acc agc cca ctt gc

REVERSE ctc cca cat ctg ccc ttt ag

**EXON 24** 

FORWARD cct ggc aag atg aat gtg tg

REVERSE cac aca gag gga agc cat tt

**EXON 25** 

FORWARD ggg tgt ggt gca gta gtg tg

REVERSE cag gca gag agt gat ttg gag

**EXON 26** 

FORWARD atg gca gag gtt ggg agt g

REVERSE ttt ctc cct gct tct tgc ac

**EXON 27** 

FORWARD ggg ata cag gcc aga tgt cta

REVERSE aca atc agc cac ctt ggt tc

**EXON 28** 

FORWARD aaa cat ggc ggc cag tag

REVERSE ctc agt gtg tgc gtg tgt tg

**EXON 29** 

FORWARD ccc aca tca ggc tgt gtc ta

REVERSE agg cag ctt gag aga gaa cg

**EXON 30** 

FORWARD gag cct ccc tct gca ggt a

REVERSE ggt gtc cac acg atc tgg ta

**EXONS 31 e 32** 

FORWARD agc atg agc ttg tgg gac at

REVERSE tgt ctc cag tga cga agg tg

**EXON 33** 

FORWARD ccc tct cca gcc tta aga aga

REVERSE gca tgg gcc aca gct agt at

**EXON 34** 

FORWARD ggg aag agt cca agg agg ag

REVERSE cag gag act gcg atg tct ga

**EXONS 35 e 36** 

FORWARD at a ccc tgt gac ctc cca ca

REVERSE cct cct ctt tgt gct cca ga

**EXON 37** 

FORWARD gcc aga cct cca act cag tc

REVERSE cca ggc ttc aga ctc caa ac

**EXON 38** 

FORWARD gcc tcc aca ttg ttg tgt ca

REVERSE ttc tgc aac aca tag cat ttg a

**EXON 39** 

FORWARD gct gag tcc agt ccc tga gt

REVERSE gag gtc tga ggg aag cac ag

**EXON 40** 

FORWARD ccc aca gtg aca gga cat tct

REVERSE ttt gct cac aca gct tct gc

## Livros Grátis

( <a href="http://www.livrosgratis.com.br">http://www.livrosgratis.com.br</a>)

## Milhares de Livros para Download:

<u>Baixar</u>	livros	de	Adm	<u>inis</u>	tra	ção

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