

Silvana Maria Lovisolo

**Hiperinsulinismo congênito em crianças
brasileiras : histopatologia, proliferação
das células β do pâncreas e genética dos
canais K^+ / ATP**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lovisolo, Silvana Maria

Hiperinsulinismo congênito em crianças brasileiras : histopatologia, proliferação das células β do pâncreas e genética dos canais K^+ / ATP / Silvana Maria Lovisolo. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Maria Cláudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Hiperinsulinismo/congênito 2.Insulina/secreção 3.Canais de potássio 4.Proliferação de células 5.Imunoistoquímica/métodos

USP/FM/SBD-028/09

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Anatomia Patológica, Hospital Universitário, Universidade de São Paulo e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo nº 08/56032-0).

Dedico esta tese a minha filha **Isabella**,
pela alegria de ser mãe, e por todo o amor
e autenticidade de seus oito anos de idade.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, pelo exemplo de idealismo e competência, pelo apoio e consideração, e principalmente, por sua determinação e persistência aos objetivos iniciais desta pesquisa.

Aos pacientes com hiperinsulinismo congênito, principalmente àqueles que conheci e tive a oportunidade de acompanhar no Ambulatório de Endocrinologia do Instituto da Criança do HC-FMUSP, objeto de estudo e possibilidade de realização deste trabalho, que nos tem motivado a tentar compreender cada vez melhor esta doença.

À Dra. Thaís Della Manna da Unidade de Endocrinologia do Instituto da Criança HC-FMUSP, por sua participação e importante contribuição na elaboração desta tese, por ter me proporcionado o acesso aos dados clínicos e ao acompanhamento ambulatorial de seus pacientes no Instituto da Criança, pela solicitude em prontamente me informar sobre raros novos pacientes, pela disponibilidade em esclarecer meus questionamentos sobre o hiperinsulinismo congênito através de seu extenso conhecimento teórico e clínico, pela sua fundamental participação no exame de qualificação e pela oportunidade de apresentar parte deste estudo em pôster no Congresso Brasileiro de Pediatria.

Ao Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, do Departamento de Patologia da FMUSP, por ter me incentivado a fazer o doutorado, por sua efetiva contribuição durante o período em que foi nosso diretor no Serviço de

Anatomia Patológica do HU-USP e pela indispensável colaboração na elaboração da análise e do raciocínio estatísticos desta tese.

Ao Prof. Venâncio Avancini Ferreira Alves, do Departamento de Patologia da FMUSP, por ter nos ensinado a importância da metodologia e da apresentação de uma tese, pelo excelente nível do debate durante os seminários do curso de pós-graduação em patologia hepática e por sua participação no exame de qualificação.

À Profa. Thaís Mauad, do Departamento de Patologia da FMUSP, pelas sugestões, considerações e críticas no exame de qualificação.

À Profa. Berenice Bilharinho Mendonça, pela oportunidade de realizar a análise genético-molecular desta pesquisa no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Divisão de Endocrinologia e Metabologia do HC-FMUSP.

À Profa. Nancy Amaral Rebouças, do Departamento de Fisiologia e Biofísica de Membranas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), por ter me proporcionado a oportunidade de permanecer em seu laboratório por quase um ano realizando a análise genética de parte dos controles desta pesquisa, por sua receptividade e disponibilidade em ensinar biologia molecular na bancada do laboratório e pela gentileza de ceder parte dos *primers* desta tese.

Ao Prof. Jorge R. Oksenberg, do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade da Califórnia San Francisco pela receptividade e oportunidade de permanecer no laboratório de genética molecular da UCSF em 2006 e participar das reuniões clínicas e de pesquisa.

Ao Prof. Thomas L. Piazza, do Departamento de Estatística da Faculdade de Saúde Pública da Universidade da Califórnia Berkeley pela receptividade e pelas valiosas sugestões de epidemiologia genética.

À Profa. Edna Diniz, da Divisão de Clínica Pediátrica do HU-USP e do Instituto da Criança do HC-FMUSP, pelo incentivo, motivação e interesse nos recém-nascidos hiperinsulinêmicos, e pela oportunidade de apresentar um dos pacientes em relato de caso.

À Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP pela consultoria técnica em imuno-histoquímica.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva (Burns), do Laboratório de Poluição Ambiental do Departamento de Patologia da FMUSP pela atenção e oportunidade de utilizar o analisador de imagens do computador de morfometria digital.

À Cristina Maria Podestá Guimarães, biomédica responsável pelo setor de imuno-histoquímica do Laboratório de Anatomia Patológica do HU-USP, que realizou as reações imuno-histoquímicas de dupla marcação, padronizando novas técnicas e novos anticorpos de pesquisa, agradeço a disponibilidade, a atenção, a presteza e a capacidade técnica, indispensáveis para a elaboração desta tese.

À Emilia Modolo Pinto, ex-bióloga do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Divisão de Endocrinologia e Metabologia do HC-FMUSP, atualmente no Departamento de Patologia e a Aline Firmiano pela extração de DNA e sequenciamento genético dos pacientes.

À Andrea Monteiro Peixoto Sousa, bióloga responsável pelo setor de histoquímica do Laboratório de Anatomia Patológica do HU-USP por refazer novos blocos de todos os casos, pela execução dos cortes histológicos e pela confecção das lâminas.

À Rosa Maria da Conceição Zanardi, secretária da Anatomia Patológica do HU-USP pela colaboração na formatação das fotos e tabelas, e a Josué Moreira de Souza do Serviço de Documentação Científica da FMUSP pela formatação da tese.

À Fátima do SAME do Instituto da Criança pelo auxílio no levantamento dos prontuários novos e antigos, e a Rafael do Arquivo de Blocos da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP pela paciência na busca de blocos arquivados há mais de 20 anos.

À todos os funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do HU-USP, médicos, técnicas, cito-técnicas, secretárias, técnicos e auxiliares de necrópsia, pelo apoio e consideração, pela amizade e colegismo comigo compartilhados nestes 11 anos em que estamos trabalhando juntos.

Ao meu pai Remo, pela confiança, liberdade e educação recebidas, por sua capacidade profissional, por seu discernimento existencial e intelectual, e pelo exemplo de que só o trabalho nos faz crescer.

À minha mãe Wilma pela sua preocupação constante com nosso bem estar, e pelo tempo, atenção e amor dedicados à minha filha.

Ao meu marido Marcelo, pelo amor, bom senso e perspicácia de sua análise crítica e principalmente por me ouvir.

Ao meu irmão Renato pela solidariedade e colaboração, e a seu filho Arthur, pelo interesse, motivação e sugestões.

Aos amigos Eric Anton Wijnen, Lenira Moraes e Marco Antonio Gomes Perez pela amizade e pela compatibilidade intelectual compartilhada nas longas conversas dos últimos 25 anos.

À Maria Cristina Ramos Corrêa e Maria de Fátima Araújo pelo carinho e atenção com que cuidaram de minha filha para que eu tivesse tempo e tranquilidade para a realização deste estudo.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.



MEDICINA



*Assim como Galileu tirou a Terra
do centro do Universo, ali colocando o Sol,
no centro da investigação científica
deve ser colocado o sujeito observador,
não mais o objeto.*

Immanuel Kant

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	Histórico.....	12
2.2	Aspectos etiológicos da hipoglicemias neonatal	14
2.3	Aspectos genéticos das diversas formas de CHI	17
2.4	Aspectos epidemiológicos	22
2.5	Aspectos clínicos e diagnósticos do CHI	23
2.5.1	Critérios diagnósticos clínico-laboratoriais (<i>Dunne et al al., 2004</i>)	23
2.5.2	Diagnóstico diferencial das formas difusa e focal do CHI-K ^{ATP}	27
2.6	Aspectos terapêuticos	29
2.6.1	Tratamento clínico	29
2.6.2	Tratamento cirúrgico.....	31
2.7	Aspectos evolutivos e prognósticos.....	35
2.8	Aspectos embriológicos e anátomo-patológicos.....	36
2.9	Aspectos imuno-histoquímicos do pâncreas endócrino.....	43
2.9.1	Proliferação das células β no CHI (perinatal e neonatal) e no pâncreas normal (gestacional e neonatal).....	43
2.10	Aspectos genéticos e moleculares relacionados à função e à resposta terapêutica.....	48
2.10.1	Mecanismo de secreção da insulina.....	48

2.10.2	Estrutura e função dos canais iônicos de membrana K ^{ATP} das células β.....	53
2.10.3	Mutações nos genes <i>ABCC8</i> (SUR 1) e <i>KCNJ11</i> (Kir 6.2) dos canais de membrana K ^{ATP}	57
3	OBJETIVOS	62
4	MÉTODOS	64
4.1	CASUÍSTICA	65
4.1.1	Seleção dos casos e revisão histológica	65
4.2	MÉTODOS	68
4.2.1	Dados clínicos	68
4.2.2	Parâmetros histológicos e imuno-histoquímicos do CHI-K ^{ATP}	68
4.2.2.1	Forma Focal.....	69
4.2.2.2	Forma Difusa	70
4.2.3	Estudo imuno-histoquímico (IHQ) com os anticorpos insulina e Ki-67 separadamente	71
4.2.4	Estudo imuno-histoquímico (IHQ) de dupla marcação : insulina e Ki-67 simultaneamente.....	71
4.2.4.1	Quantificação da expressão de Ki-67 nas células β.....	72
4.2.5	Estudo imuno-histoquímico das proteínas SUR 1 e Kir 6.2 dos canais K ^{ATP} das células β	73
4.2.6	Estudo genético-molecular para pesquisa de mutações nos genes <i>ABCC8</i> (SUR 1) e <i>KCNJ11</i> (Kir 6.2)	74
4.2.6.1	Extração de DNA do sangue periférico.....	74
4.2.6.2	Extração de DNA do tecido pancreático incluído em parafina	74
4.2.6.3	Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	75
4.2.6.4	Sequenciamento automático	77
4.3	Análise estatística.....	77

5	RESULTADOS	78
5.1	Dados clínicos	79
5.2	Aspectos histopatológicos	82
5.3	Aspectos imuno-histoquímicos	95
5.3.1	Avaliação da proliferação das células β	95
5.3.2	Aspectos imuno-histoquímicos das proteínas SUR 1 e Kir 6.2 dos canais K ^{ATP}	102
5.3.3	Aspectos genético-moleculares dos genes ABCC8 (SUR 1) e KCNJ11 (Kir 6.2)	105
6	DISCUSSÃO	107
7	CONCLUSÕES	118
8	ANEXOS.....	121
9	REFERÊNCIAS	141

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CHI : hiperinsulinismo congênito relacionado aos canais K^{ATP}

Canais K⁺ / ATP: canais de potássio ATP dependentes

ATP: adenosina trifosfato

ADP: adenosina difosfato

SUR 1 : proteína Sulfonylurea Receptor 1

ABCC8 : gene ATP-Binding Cassette transporter sub-family C member 8

Kir 6.2 : proteína K+ channel inward rectifier 6.2

KCNJ11: gene K+ Channel iNwardly rectifying subfamily J member 11

DNA : ácido desoxiribonucleico

RNAi : ácido ribonucleico de interferência

GDH : glutamato desidrogenase

GLUD 1 : gene codificador do GDH

GK : glucoquinase

SCHAD : 3-hidroxiacil coenzima A desidrogenase de cadeia curta

IGF-2 : insulin-like growth factor 2

H19 : gene regulador do gene IGF-2

CDKN1C : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C

p57^{Kip2}: sinônimo do CDKN1C

PET-CT: tomografia computadorizada por emissão de pósitrons

[¹⁸F]-L-Dopa : 18F fluoro - L - dihidroxifenilalanina (dopamina)

IHQ : imuno-histoquímica

Ki-67 : anticorpo nuclear indicador de proliferação celular

β : beta

α : alfa

γ : gama

ς : sigma

μm : micrômetros

$\mu\text{U}/\text{mL}$: microunidades por mililitro

mg/dL : miligramas por decilitro

mM : milimolar

mm : milímetros

$\mu\text{g}/\text{kg}$: microgramas por kilograma

mV : milivolts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: ^{18}F -fluoro-L-Dopa-PET-CT scan	28
Figura 2: Esquema de conduta pediátrica na hipoglicemia neonatal.....	34
Figura 3: Mecanismo de secreção de insulina na célula β	50
Figura 4: Subunidade proteica SUR1 dos canais K^{ATP}	54
Figura 5: Características estruturais dos canais K^{ATP} das células β	56
Figura 6: Análise digital morfométrica.....	73
Figura 7: Critérios histológicos funcionais.....	87
Figura 8: Critérios histológicos de migração	87
Figura 9: CHI-Difuso – H&E	88
Figura 10: CHI-Difuso – H&E	88
Figura 11: CHI-Difuso – H&E	89
Figura 12: CHI-Difuso – H&E	89
Figura 13: CHI-Focal – IHQ insulina	90
Figura 14: CHI-Focal – IHQ insulina	90
Figura 15: CHI-Focal – IHQ insulina	91
Figura 16: CHI-Focal – IHQ insulina	91
Figura 17: Controle – célula β em proliferação – (IHQ – insulina/ <i>Permanent Red</i> e Ki-67/DAB).....	99
Figura 18: CHI-Difuso – células β em proliferação – (IHQ – insulina/ <i>Permanent Red</i> e Ki-67/DAB).....	99
Figura 19: CHI-Focal – área focal adenomatosa (H&E).....	100
Figura 20: CHI-Focal – área focal adenomatosa com alto índice proliferativo das células β (IHQ – insulina/ <i>Permanent Red</i> e Ki-67/DAB) ...	100
Figura 21: Controle – agregados frouxos de ilhotas (IHQ – insulina/ <i>Permanent Red</i> e Ki-67/DAB – 200X).....	92
Figura 22: CHI-Difuso – agregado frouxo de ilhotas – IHQ insulina/Ki-67 ...	92

Figura 23: CHI-Difuso – agregado frouxo de ilhotas – IHQ insulina/Ki-67 ...	92
Figura 24: CHI-Focal – complexo díctulo-insular em área de pâncreas normal (IHQ – insulina)	93
Figura 25: CHI-Difuso – complexo díctulo-insular.....	93
Figura 26: CHI-Difuso – complexo díctulo-insular.....	93
Figura 27: CHI-Difuso – complexo díctulo-insular e células β isoladas.....	94
Figura 28: CHI-Difuso – ilhotas de tamanho variável e células β isoladas	94
Figura 29: CHI-Difuso – complexo díctulo-insular e células β isoladas	94
Figura 30: Gráfico da frequência do índice de proliferação das células β (% Ki - 67- LI) nos grupos etários de pacientes e controles.....	101
Figura 31: CHI-Difuso – subunidade proteica Kir 6.2 dos canais K+ / ATP das células β (IHQ – Kir 6.2).....	103
Figura 32: CHI-Difuso – subunidade proteica SUR 1 dos canais K+ / ATP das células β (IHQ – SUR 1).....	103
Figura 33: CHI-Difuso – subunidade proteica Kir 6.2 dos canais K+ / ATP das células β (IHQ – Kir 6.2).....	104
Figura 34: CHI-Difuso – subunidade proteica Kir 6.2 dos canais K+ / ATP das células β (IHQ – Kir 6.2).....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Causas de óbito dos controles de necrópsias	67
Tabela 2: Primers para o gene <i>KCNJ11</i> (Kir 6.2).....	76
Tabela 3: Primers para o gene <i>ABCC8</i> (SUR 1)	76
Tabela 4: Dados clínicos	81
Tabela 5: Alterações histológicas dos pacientes com CHI difuso	84
Tabela 6: Histologia dos controles \leq 3 meses de idade	85
Tabela 7: Histologia dos controles $>$ 3 meses de idade	86
Tabela 8: Índice proliferativo das células β dos pacientes (Ki-67-LI).....	96
Tabela 9: Índice proliferativo das células β dos controles (Ki-67-LI)	97
Tabela 10: Valores médios de % Ki-67-LI nos controles e nos pacientes com a forma difusa do CHI de acordo com a idade	98
Tabela 11: Resultado do sequenciamento automático para o exon único do gene <i>KCNJ11</i> (Kir 6.2)	106
Tabela 12: Resultado do sequenciamento automático para os exons 33-37 do gene <i>ABCC8</i> (SUR 1).	106

RESUMO

Lovisolo SM. *Hiperinsulinismo congênito em crianças brasileiras: histopatologia, proliferação das células β do pâncreas e genética dos canais K^{ATP}* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 161p.

O hiperinsulinismo congênito (CHI) é um distúrbio do pâncreas endócrino, mais freqüentemente causado por alterações dos canais de membrana K^{ATP} das células β , resultando em secreção inapropriada de insulina e hipoglicemia severa e persistente nos recém-nascidos, que leva ao óbito ou a seqüelas neurológicas graves, se não diagnosticado a tempo. O diagnóstico depende da análise dos dados clínicos, laboratoriais, morfológicos e genético-moleculares (50% apresentam mutações dos canais K^{ATP}). As duas formas histopatológicas descritas requerem cirurgias radicalmente opostas: pancreatectomia quase-total (95-98%) na forma difusa que acomete todo o pâncreas, ou apenas exerese do foco adenomatoso de células β , medindo em média 4,5 mm, na forma focal, e portanto a sua distinção é essencial durante o exame intra-operatório de congelação ou através de [¹⁸F]-L-Dopa PET-CT. Dez pacientes com CHI difuso e um com CHI focal, submetidos a pancreatectomia, foram analisados em relação a parâmetros clínicos, histopatológicos, de proliferação das células β (IHQ de dupla marcação Ki-67 / insulina) e quanto à presença de mutações nos genes das únicas duas proteínas (SUR 1 e Kir 6.2) que formam os canais K^{ATP}, e comparados a 19 pâncreas controles normais da mesma faixa etária. Pacientes e controles foram estratificados em \leq 3 meses e $>$ 3 meses de idade. Nucleomegalia, ausente nos controles, foi observada apenas na forma difusa. Os critérios histológicos de maturação normalmente mais freqüentes nos controles \leq 3 meses, foram freqüentemente observados nos recém-nascidos com CHI difuso $>$ 3 meses, sugerindo um retardado na maturação do pâncreas endócrino destes pacientes. O índice de proliferação das células β (Ki-67-LI), muito elevado nos focos adenomatosos da forma focal, foi útil na distinção destes focos dos “agregados frouxos de ilhotas”, histologicamente muito semelhantes, observados em dois casos difusos e um controle, que apresentam níveis de Ki-67-LI cerca de 10 vezes menor. Na forma difusa o Ki-67-LI também foi estatisticamente mais alto do que nos controles. Este é o primeiro estudo de pacientes com CHI no Brasil, e embora existam diferenças epidemiológicas entre os países relacionadas à determinação genética do CHI, não foram constatadas mutações ou novos polimorfismos nos exons 33-37 do gene ABCC8 (SUR 1) de 10/10 pacientes ou no único exon do gene KCNJ11 (Kir 6.2) de 4/10 pacientes.

Descritores: 1.Hiperinsulinismo / congênito 2.Insulina / secreção 3.Canais de potássio 4.Proliferação de células 5.Imunoistoquímica / métodos

SUMMARY

Lovisolo SM. *Congenital Hyperinsulinism in Brazilian Neonates : histopathology, β -cells proliferation and K^{ATP} channels genes* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 161p.

Congenital hyperinsulinism (CHI) is a rare pancreatic endocrine cell disease which most severe cases are found to be, at least in half of patients, associated with genetic defects in the β -cell K^{ATP} channels. The aim of this study was to evaluate eleven Brazilian patients diagnosed, by standard criteria, as CHI non responsive to clinical therapy, and submitted to pancreatectomy, regarding: histology, β -cell proliferation (IHC Ki-67 / insulin) and β -cell K^{ATP} channels genes mutations in blood samples. For comparison of histology and β -cell proliferation, 19 pancreatic control samples were included. According histology, ten patients were classified as diffuse and one as focal form. Nucleomegaly and β -cells with abundant cytoplasm were absent in controls, and observed only in the group of diffuse CHI patients. Ki-67-LI was useful to differentiate the adenomatous areas of the focal form CHI neonate from "loose clusters of islets" found in two diffuse form and one control samples. Proliferation was much higher in the focal CHI adenomatous areas, but diffuse CHI patients also have statistically higher Ki-67-LI than controls. This is the first genetic study of CHI patients in Brazil, and no mutations or new polymorphisms were found in the *ABCC8* gene (SUR 1) (exons 33-37) or in the only exon of *KCNJ11* gene (Kir 6.2) in 4/4 patients evaluated. On the other hand, enhanced β -cell proliferation seems to be a constant feature in these patients both in diffuse and focal forms.

Descriptors: 1.Hyperinsulinism/congenital 2.Insulin/secretion 3.Potassium channels 4.Cell proliferation 5.Immunohistochemistry/methods

1 INTRODUÇÃO

No texto *The Wisdom of the Body*, o médico fisiologista britânico Walter Bradford Cannon (1871-1945) definiu o conceito de homeostase como: “o conjunto de reações fisiológicas coordenadas, entre componentes dinâmicos, que mantém o equilíbrio em *steady states* (*condições estáveis*) compatíveis com a vida”. Entre estes *steady states*, um dos mais importantes é o da concentração sanguínea de glicose. O mecanismo homeostático da glicose garante que as flutuações dos níveis glicêmicos, inevitáveis após cada refeição, sejam apenas transitórias. Os níveis glicêmicos não devem ser muito baixos a ponto de privar o cérebro de combustível causando prejuízo cognitivo e perda da consciência, ou muito altos a ponto das membranas lipoprotéicas sofrerem glicagrem e suas consequências a longo prazo: retinopatia, neuropatia periférica, nefropatia e cardiopatia. Quando este aparato homeostático falha, a consequência é o diabetes mellitus ou, de forma oposta, o hiperinsulinismo (**Ashcroft et al., 2007**).

A homeostase glicêmica é mantida fundamentalmente pela regulação da secreção de insulina em resposta às concentrações flutuantes de glicose sérica. A insulina é uma proteína, um hormônio peptídico produzido e secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas quando os níveis de glicemia se elevam acima do normal (aproximadamente 5 mM).

Neste estudo focalizaremos os componentes essenciais das células β para a regulação da secreção de insulina : os canais K^+ / ATP (canais iônicos

localizados na membrana das células β , específicos para o trânsito do potássio entre os meios intra e extra-celular, gerando diferenças de potencial elétrico da membrana celular, e cujo funcionamento depende das concentrações intra-celulares de ATP resultantes do metabolismo da glicose).

Muitos hormônios são capazes de aumentar os níveis de glicose no sangue, porém a insulina é o único hormônio que reduz a concentração sanguínea de glicose; isto ocorre tanto pela inibição da gliconeogênese (produção de glicose a partir do glicogênio hepático), como pela ativação da glicogênese (produção de glicogênio a partir da glicose sérica) e pela ativação do consumo de glicose pelas células musculares. Além de promover a utilização da glicose, a insulina estimula tanto a síntese de proteínas como a síntese e o armazenamento dos lipídeos neutros, inibe a lipólise com consequente redução dos ácidos graxos livres e dos corpos cetônicos resultantes do catabolismo dos lipídeos.

A secreção inadequada deste hormônio pode ter consequências fisiopatológicas determinantes nas diversas formas do diabetes mellitus (secreção sub-normal de insulina) e no hiperinsulinismo (hipersecreção ou persistência da secreção de insulina sob condição hipoglicêmica).

O hiperinsulinismo *sensu latu* representa um conjunto de desordens heterogêneas sob os aspectos genético-molecular, fisiopatológico, morfológico e clínico, sendo uma condição potencialmente devastadora e um dos problemas mais complexos da endocrinologia pediátrica. O termo hiperinsulinismo sugere, erroneamente, hipersecreção de insulina pelas células β , porém nem sempre a insulina está aumentada nos pacientes. O

hiperinsulinismo é melhor definido como uma secreção inapropriada de insulina para um dado nível de glicemia, associada à supressão inadequada da secreção de insulina durante concentrações baixas de glicose plasmática.

Na fisiopatologia desta condição há perda do mecanismo de *feedback* da células β e a insulina continua a ser secretada apesar do estado de hipoglicemia do paciente. Portanto o diagnóstico clínico depende da evidência dos efeitos da secreção de insulina sob condição de hipoglicemia, que incluem níveis muito baixos de glicemia, supressão da lipólise e da cetogênese, e respostas glicêmicas positivas após a administração de glucagon durante a hipoglicemia, pois o glucagon estimula a glicogenólise e mobiliza a glicose a partir do glicogênio hepático.

Segundo **Glaser et al., 1999** os critérios diagnósticos do hiperinsulinismo são: 1) níveis de glicose sanguínea menores de 48 mg/dl; 2) níveis de insulina não suprimidos durante a hipoglicemia; 3) níveis inapropriadamente baixos de ácidos graxos livres e de corpos cetônicos durante a hipoglicemia; 4) resposta glicêmica maior do que 30 mg/dl após injeção de 0,03 mg/kg de glucagon (teste do glucagon); 5) necessidade de reposição de glicose maior do que 15 mg/kg/min para manter a euglicemia e 6) ausência de corpos cetônicos na urina.

As concentrações séricas reduzidas de ácidos graxos livres refletem a supressão da lipólise e a supressão da cetogênese, associadas ao hiperinsulinismo. Em condição de hipoglicemia, o coração e o músculo esquelético utilizam ácidos graxos como substrato energético alternativo para o seu metabolismo, resultando na produção de cetonas. Os ácidos

graxos não ultrapassam a barreira hemato-encefálica e portanto, não podem ser usados pelo cérebro, mas os corpos cetônicos atravessam esta barreira e poderiam ser utilizados pelo cérebro como um substrato energético alternativo, porém tanto os ácidos graxos como os corpos cetônicos estão reduzidos pelo excesso de insulina.

Assim a associação de hipoglicemia, de disponibilidade reduzida de ácidos graxos livres como alternativa para o metabolismo cardíaco e muscular e de quantidade reduzida de corpos cetônicos como alternativa para o metabolismo cerebral, resulta em sintomas adrenérgicos e neuroglicopênicos com disfunção neurológica grave e morte neuronal com dano neurológico permanente incluindo atraso do desenvolvimento e retardamento. A atividade convulsiva se manifesta quando os níveis de glicose no SNC caem abaixo de 20-30 mg/dl. As complicações do hiperinsulinismo neonatal persistente são encontradas em mais de 50% dos sobreviventes (**Leibowitz et al., 1995**).

O hiperinsulinismo transitório está presente em recém-nascidos de mães diabéticas. Durante a gestação, a glicose é transferida livremente através da placenta e, a hiperglicemia prolongada de mães com diabetes mellitus mal controlado resulta em hiperglicemia fetal que induz a proliferação, neste caso secundária, de células β pancreáticas fetais com conseqüente hiperinsulinemia e macrosomia. A interrupção do suprimento transplacentário de glicose após o nascimento leva a uma queda abrupta na concentração de glicose sérica do recém-nascido e, na ausência de outros distúrbios, este tipo de hiperinsulinismo regide em 1 a 2 dias após o

nascimento. Outras condições que também estão associadas ao hiperinsulinismo em crianças são o adenoma insulino-secretor (insulinoma), a incompatibilidade Rhesus e o stress perinatal relacionado à asfixia do nascimento, à toxemia materna, ao retardo do crescimento intra-uterino e à administração de insulina ou drogas exógenas.

O hiperinsulinismo congênito (CHI), antigamente chamado nesidioblastose ou hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente da infância (PHHI) é uma condição rara e potencialmente letal em recém-nascidos e em crianças.

Até recentemente o hiperinsulinismo congênito (CHI) foi considerado um distúrbio de patogênese não esclarecida, porém como alterações paralelas nos canais iônicos, nas enzimas e nas vias metabólicas das células β também desencadeiam o diabetes mellitus neonatal, a investigação genético-molecular do CHI nos últimos dez anos teve repercussões importantes no esclarecimento dos distúrbios mais freqüentes do pâncreas endócrino como o diabetes, e no desenvolvimento da pesquisa da fisiologia molecular do transporte iônico das membranas celulares.

Os mecanismos patogenéticos envolvidos no hiperinsulinismo congênito são variados e numerosos, compreendendo desde alterações genéticas nas sub-unidades protéicas que formam os canais iônicos de potássio ATP dependentes (K^+ / ATP) localizados na superfície da membrana celular das células β , até defeitos nas enzimas do metabolismo da glicose no interior das mitocôndrias. A maioria das crianças com CHI apresenta alterações de uma mesma estrutura-alvo: os canais de potássio ATP

(trifosfato de adenosina) dependentes (canais K⁺ / ATP) da membrana celular das células β, e apesar de raro, o CHI associado às alterações dos canais K⁺ / ATP é a causa mais freqüente de hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente e severa do recém-nascido (**Glaser et al., 1999**).

O hiperinsulinismo congênito (CHI) foi descrito na década de 1950 por **Mac Quarrie (1954 apud Dunne et al., 2004)**, mas a patogênese desta síndrome foi recentemente esclarecida pelo desenvolvimento da genética molecular a partir da década de 1990 com os estudos de **Glaser et al., 1990** e **Thomas et al., 1995**, demonstrando que a ausência de função dos canais iônicos da membrana das células β (K⁺ / ATP) era responsável pelo hiperinsulinismo. Os recém-nascidos e as crianças que não responderam ao tratamento clínico com medicamentos, entre os quais o diazóxido, que age nos canais, foram submetidos ao tratamento cirúrgico com pancreatectomia parcial ou quase-total. O estudo anátomo-patológico do tecido pancreático revelou alterações histológicas variáveis e não específicas, sugerindo, a princípio, que a patogênese estaria relacionada a alterações metabólicas ou genético-moleculares do mecanismo de secreção de insulina pelas células β, direcionando a pesquisa nessa direção (**Meissner et al., 1999; Lüthge-Reinecke et al., 2000**).

Apesar da variedade histológica observada, **Sempoux et al., 1998** e **Rahier et al., 1998** descreveram duas formas histopatológicas distintas. A primeira forma (focal) é caracterizada pela presença de área(s) focal(ais) pancreática(s) de hiperplasia denominada hiperplasia adenomatosa focal, estes pacientes podem ser tratados através uma pancreatectomia restrita à área da

lesão. Na segunda forma (difusa), o pâncreas pode ser histologicamente normal ou apresentar alterações cito-arquiteturais não-hiperplásicas difusamente distribuídas por todo o pâncreas, estes pacientes precisam de uma pancreatectomia subtotal ou quase-total para reverter a hipoglicemia.

Até então, a patogênese do hiperinsulinismo congênito foi inconsistentemente relacionada à nesidioblastose (*nesidio* é uma palavra grega que significa ilha), definida por *Laidlaw (1938 Apud Dunne et al., 2004)* como neoformação de ilhotas de Langerhans a partir do epitélio ductal ou proliferação persistente de células β ‘brotando’ dos ductos pancreáticos exócrinos. Em **1971**, após aproximadamente 40 anos, *Yakovac et al. (Apud Dunne et al., 2004)* foi o primeiro a referir a presença de nesidioblastose em uma série de crianças com hipoglicemia intratável. Foi somente no final da década de 90, em um estudo de *Rahier et al., 2000*, que ficou definitivamente estabelecido que o hiperinsulinismo congênito não pode ser vinculado à nesidioblastose, pois esta ocorre em crianças e recém-nascidos sadios, fazendo parte da continuidade do desenvolvimento embriológico normal extra-uterino. Porém até hoje, passados quase dez anos, o termo *nesidioblastose* permanece sendo frequentemente utilizado como sinônimo de CHI.

Nos últimos anos, o desenvolvimento da pesquisa no contexto da biologia molecular, permitiu o esclarecimento dos determinantes genéticos e das vias metabólicas das células β no processo de secreção de insulina; e a disponibilidade de tecido pancreático dos pacientes obtido através de pancreatectomia, permitiu a melhor compreensão das bases fisiologicas e anatómico-patológicas do CHI resultando em descobertas sem precedentes na sua

patogênese com consequências no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos (**Suchi et al., 2004; Subramanian et al., 2007; Peranteau et al., 2007; Ribeiro et al., 2007; Kapoor et al., 2008**), no aprimoramento da terapêutica (**Dunne et al., 2004; De Vroede et al., 2004**), no diagnóstico precoce pré-natal (**Peranteau et al., 2006**) e no aconselhamento genético.

Atualmente são conhecidas mutações em 06 genes que causam o hiperinsulinismo congênito de origem genética ou hipoglicemia hiperinsulinêmica familiar (HHF): nos genes *ABCC8* (HHF 1) e *KCNJ11* (HHF 2) das proteínas SUR 1 e Kir 6.2 que formam os canais K⁺ / ATP, no gene *GCK* (HHF 3) da enzima glucoquinase, no gene *HADH* (HHF 4) da enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCHAD), no gene *INSR* (HHF 5) do receptor de insulina e no gene *GLUD1* (HHF 6) da enzima glutamato hidrogenase.

A identificação das causas moleculares do CHI permitiu compreender a heterogeneidade clínica dos pacientes portadores dessa condição. Da mesma forma, o reconhecimento das duas apresentações histopatológicas distintas do hiperinsulinismo congênito relacionado aos canais K^{ATP}, possibilitou a elaboração de protocolos de abordagem diagnóstica destes pacientes, com o objetivo de distinguir as formas focal e difusa para localizar as lesões focais e assim garantir a cura cirúrgica. Por outro lado, há poucos avanços recentes no desenvolvimento de um tratamento farmacológico ou genético-molecular efetivo e, nos próximos anos, os esforços deverão ser direcionados para esta finalidade. Uma abordagem multidisciplinar envolvendo endócrino-pediatras, cirurgiões pediátricos, radiologistas e

patologistas é fundamental no direcionamento de um tratamento adequado e menos invasivo destas crianças, com o objetivo de evitar, por um lado, o desenvolvimento do diabetes mellitus secundário à pancreatectomia extensa, e por outro, a ocorrência de retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor secundário à hipoglicemia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A hipoglicemia neonatal foi primeiramente descrita como entidade clínica em recém-nascidos e crianças maiores por **Hartmann e Jaudon (1937 Apud Dunne et al., 2004)**. Curiosamente, esta referência não considerava a hipoglicemia neonatal uma entidade específica, mas somente um sintoma da falha de adaptação do estado fetal de consumo contínuo de glicose transplacentária, para o padrão extra-uterino de suprimento nutricional intermitente. Esta perspectiva de imaturidade do desenvolvimento da célula β prevaleceu por muitos anos, e foi somente nos anos 1970 e 1980 que o conceito de hiperinsulinismo foi proposto e gradualmente aceito.

A descrição anátomo-patológica mais antiga do hiperinsulinismo parece ter sido a de **Laidlaw (1938 Apud Dunne et al., 2004)** que publicou um estudo no **American Journal of Pathology** intitulado “*Nesidioblastoma: the islet tumor of the pancreas*” usando o termo nesidioblastose para descrever a hipoglicemia severa e recorrente associada à elevação inapropriada da insulina, do C-peptídeo e da pró-insulina séricos.

Mac Quarrie (1954 Apud Dunne et al., 2004) publica a primeira descrição do hiperinsulinismo congênito sob a designação de “hipoglicemia idiopática da infância”. Durante muito tempo, o hiperinsulinismo congênito foi referido por diversos termos, incluindo nesidioblastose, hipoglicemia sensível a

leucina, síndrome da disfunção insular e hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente da infância.

Yakovac (1971 apud Dunne et al., 2004) substitui o termo hipoglicemia idiopática da infância por nesidioblastose, e é o primeiro a referir a presença de nesidioblastose no pâncreas de uma série de crianças com hipoglicemia persistente.

Posteriormente **Rahier** em **2000** demonstrou que a nesidioblastose não faz parte da patogênese do hiperinsulinismo, já que ela descreve a neo-diferenciação das ilhotas de Langerhans a partir do sistema túbulo-ductal do pâncreas exócrino que ocorre em recém-nascidos e crianças normais, sendo incorreto utilizar este termo como referência às lesões associadas ao hiperinsulinismo (**Kaczirek et al., 2004**).

A identificação do cromossomo envolvido no hiperinsulinismo congênito (CHI) foi realizada através de um estudo (**Glaser et al., 1994**) de análise genética de linkage de 15 famílias com 29 gêmeos doentes e 33 gêmeos saudáveis: 12 famílias de judeus Ashkenazi, 2 famílias de árabes consangüíneos e 1 família de europeus caucasianos não-judeus. Este estudo mapeou o hiperinsulinismo congênito no cromossomo 11p14-15.1. Nos pacientes judeus Ashkenazi consangüíneos a associação do CHI com os haplotipos é consistente com um efeito fundador nesta população. A análise de segregação destas famílias mostrou que a razão entre gêmeos doentes e gêmeos saudáveis é consistente com o padrão de herança autossômica recessiva.

Através de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) **Thomas et al., 1995** demonstrou que os genes das subunidades SUR1 e Kir 6.2 dos canais K^{ATP} situam-se em posições adjacentes 14-15.1 no cromossomo 11p.

A partir do ano 2000, os estudos do hiperinsulinismo congênito voltaram-se para a identificação das mutações nos genes envolvidos na doença, para o esclarecimento da fisiologia e da fisiopatologia da secreção de insulina no contexto do metabolismo molecular da célula β e para o aprimoramento de novos métodos diagnósticos para distinguir as duas formas histopatológicas e orientar a terapêutica.

2.2 Aspectos etiológicos da hipoglicemia neonatal

A hipoglicemia é um problema freqüente nos recém-nascidos, e deve ser diagnosticada e tratada eficazmente para evitar crises convulsivas e dano cerebral permanente. A abordagem destes pacientes torna-se complexa, considerando-se que a hipoglicemia nos recém-nascidos pode apresentar uma ampla variedade de causas incluindo formas transitórias que podem ocorrer em crianças normais, formas mais prolongadas associadas a complicações da gestação e do parto, e a hipoglicemia neonatal permanente devida às disfunções endócrinas ou metabólicas (*De León et al., 2007*).

O risco de complicações destas várias formas se altera dramaticamente após os primeiros poucos dias de vida. Por exemplo, sabe-se, há mais de trinta anos, que aproximadamente 50% dos recém-nascidos normais são incapazes, durante as primeiras 8 horas pós-parto, de manter os níveis de glicose plasmática acima de 50 mg/dl com a alimentação. O alto risco de hipoglicemia, em recém-nascidos normais, reflete o desenvolvimento incompleto ao

nascimento do metabolismo hepático da gliconeogênese e da cetogênese. Estes caminhos metabólicos rapidamente amadurecem, e com 2-3 dias de vida a susceptibilidade à hipoglicemia desaparece. O diabetes materno ou o uso de medicamentos podem contribuir para o risco de hipoglicemia durante os primeiros dias pós-parto. Complicações peri-parto, como a asfixia durante o parto ou outros estresses perinatais, podem estar associadas à hipoglicemia prolongada que pode persistir por várias semanas após o nascimento. Com exceção da imaturidade normal do metabolismo à adaptação alimentar, que é causa do alto risco de hipoglicemia nas primeiras 12 horas de vida, o hiperinsulinismo é a causa isolada mais freqüente de hipoglicemia persistente.

Em relação à hipoglicemia em recém-nascidos, a seguinte classificação etiológica é proposta, segundo revisão de **De León & Stanley de 2007**:

I - Hipoglicemia neonatal transitória:

A - Primeiro dia de vida: imaturidade do desenvolvimento à adaptação alimentar (patogênese: gliconeogênese e cetogênese imaturas)

B - Primeiros 2 dias de vida: hipoglicemia transitória devida a fatores maternos:

- 1) diabetes materno (patogênese: hiperinsulinismo)
- 2) administração de glicose endovenosa durante o trabalho de parto (patogênese: hiperinsulinismo)
- 3) uso de medicamentos: hipoglicemiantes orais, terbutalina, propranolol (patogênese: hiperinsulinismo)

II - Hipoglicemia neonatal prolongada:

- A - Hiperinsulinismo perinatal stress-induzido (baixo peso ao nascer, asfixia ao nascer, toxemia materna, pré-eclampsia, prematuridade)
- B - Síndrome de Beckwith-Wiedemann (patogênese: hiperinsulinismo devi- do a alterações epigenéticas dos genes do cromossomo 11p)
- C - Hipopituitarismo

III - Hipoglicemia neonatal permanente (causada por distúrbios congênitos endócrinos ou metabólicos)

- A - Hiperinsulinismo congênito
 - 1) Hiperinsulinismo relacionado aos canais de potássio ATP dependentes (K^{ATP} – CHI) – 85% dos casos de CHI
 - a) forma difusa (Di – CHI) – 60%
 - b) forma focal (Fo – CHI) – 40%
 - 2) Hiperinsulinismo da glutamato desidrogenase (GDH – CHI)
 - 3) Hiperinsulinismo da glucoquinase (GK – CHI)
 - 4) Hiperinsulinismo da 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCHAD – CHI)
 - 5) Alterações congênitas da glicosilação
- B - Deficiência dos hormônios contra-regulatórios:
 - 1) Hipopituitarismo
 - 2) Insuficiência adrenal
- C - Alterações das enzimas da gliconeogênese e da glicogenólise
- D - Alterações na oxidação dos ácidos graxos

2.3 Aspectos genéticos das diversas formas de CHI

1) Hiperinsulinismo relacionado aos canais de potássio ATP dependentes (K^{ATP} - CHI)

Mutações com perda de função dos canais iônicos de membrana K^{ATP} das células β do pâncreas são responsáveis pelas formas difusa e focal do hiperinsulinismo congênito relacionado aos canais K^{ATP} ; mais de 100 mutações foram descritas no gene *ABCC8* e aproximadamente 30 mutações no gene *KCNJ11* (*Fournet et al., 2003, Dunne et al., 2004; Gloyn et al., 2006*) genes localizados no cromossomo 11p15 que codificam respectivamente as sub-unidades SUR 1 e Kir 6.2 constituintes da estrutura protéica dos canais K^{ATP} .

Mutações do gene *ABCC8* (SUR 1) incluem mutações dos tipos splice-site, missense, nonsense, inserções e deleções, e estão dispersas através da região codificadora do gene, apesar de cerca de 60% destas mutações ocorrerem como agregado na região codificadora do NBF2 (*Nucleotide Binding Fold 2*) responsável pela ligação do ATP no canal, caracterizando um “hot spot” de mutações. Alguns tipos de mutação inibem completamente a atividade dos canais, enquanto outros tipos alteram a densidade dos canais ou alteram a resposta dos canais aos nucleotídeos (*Fournet et al., 2003*).

A maioria das mutações nos genes *ABCC8* e *KCNJ11* são autosômicas recessivas, entretanto algumas poucas mutações autosômicas dominantes foram descritas no gene *ABCC8* e uma mutação autosômica

dominante no gene *KCNJ11* (**Thornton et al., 2003; Lin et al., 2006**). As formas de K^{ATP} – CHI com mutações dominantes são menos graves e respondem ao tratamento com diazóxido (**De Lonlay et al., 2005**).

Curiosamente, cabe aqui referir que mutações heterozigóticas do gene *KCNJ11* (Kir 6.2) com ganho de função causam diabetes neonatal monogênico transitório ou permanente (**Gloyn et al., 2006; Smith et al., 2007**).

Na forma focal do K^{ATP} – CHI, ocorre uma situação genética peculiar com um modo de herança não-Mendeliano caracterizado por um evento somático com perda de heterozigose (LOH – *loss of heterozygosity*). Nesta forma do CHI ocorre mutação do gene *ABCC8* (SUR 1) ou do gene *KCNJ11* (Kir 6.2) herdada do pai associada a uma deleção somática de parte do alelo herdado da mãe do cromossomo 11p15 com perda de vários genes impressos nessa região resultando em *hemizigose* para esses genes (**Verkarre et al., 1998; Fournet et al., 2001**). Como essa deleção é de origem somática, ela está presente somente no DNA das células β da(s) área(s) adenomatosa(s). Nas áreas normais do pâncreas, circunjacentes à área(s) adenomatosa(s), o DNA das células β não apresenta essa deleção (**Sempoux et al., 2003**).

A deleção somática do alelo materno, com consequente silenciamento gênico e perda de heterozigose (LOH) dos genes *ABCC8* e *KCNJ11* dos canais K^{ATP} e de outros genes envolvidos na proliferação celular, altera a expressão destes genes impressos na região 11p15.5 do alelo paterno: o gene *H19* que regula o *IGF-2*, o gene *CDKN1C* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C*) também chamado *p57*, e o gene *Insulin-like Growth Factor 2*

(*IGF-2*). Os dois primeiros genes são antiproliferativos, isto é, genes supressores de tumor e o *IGF-2* é um gene promotor de crescimento. A ausência do alelo materno e o resultante desequilíbrio da expressão paterna desses genes são determinantes na hiperplasia adenomatosa focal das células β (**Kassem et al., 2001**).

O evento somático de perda da heterozigose (*LOH*) foi verificado nos pacientes com a forma focal através da análise de microsatélites que evidencia a deleção, e provavelmente ocorre durante a vida intra-uterina, pois não se repete, não sendo relatados casos de recorrência após a remoção cirúrgica do foco adenomatoso (**Sempoux et al., 2003; Suchi et al., 2006**).

Perda de heterozigose na mesma região 11p15 foi encontrada em alguns insulinomas (**Sempoux et al., 2003**) e na síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) também associada ao hiperinsulinismo neonatal (**Li et al., 1998**).

Recentemente foram descritas crianças com a forma focal que apresentavam apenas a deleção do alelo materno, não sendo encontradas mutações nos genes das sub-unidades SUR 1 ou Kir 6.2 do alelo paterno (**Suchi et al., 2006**). Este estudo levanta a hipótese de que em alguns casos com a forma focal a patogênese do CHI dependa exclusivamente da deleção somática do alelo materno.

2) Hiperinsulinismo da glutamato desidrogenase (GDH – CHI)

A segunda causa mais freqüente de hiperinsulinismo congênito, também conhecida como a síndrome do hiperinsulinismo e da hiperammonemia,

é causado por mutações com ganho de função de uma enzima mitocondrial, a glutamato desidrogenase (*Glaser et al., 1999; Stanley et al., 2004*). Esta enzima é a chave reguladora do metabolismo dos aminoácidos e da amônia nas células β pancreáticas, nas células hepáticas e nas células cerebrais, sendo normalmente ativada pela leucina.

No *GDH – CHI* ocorrem mutações missense com herança autosômica dominante do gene *GLUD-1* localizado no cromossomo 10q que causam excesso de secreção de insulina no pâncreas e excesso de produção de amônia com síntese diminuída de uréia no fígado.

A repercussão clínica desta forma de CHI é usualmente leve com episódios de hipoglicemia pós-prandiais esporádicos, sintomas tardios (em crianças maiores ou adultos), níveis plasmáticos de amônia aumentados de 3 a 5 vezes o normal, hipoglicemia induzida pela ingestão de proteínas contendo leucina e resposta positiva ao tratamento com diazóxido (*Dunne et al., 2004*).

3) Hiperinsulinismo da glucoquinase (GK – CHI)

Uma forma rara de hiperinsulinismo causada por mutações ativadoras com herança autosônica dominante no gene *GCK* localizado no cromossomo 7p que codifica a glucoquinase (*Glaser et al., 1999*), uma enzima que funciona como um sensor da glicose nas células β pancreáticas, nas células neuro-endócrinas do sistema gastro-intestinal, nos hepatócitos e nos neurônios do hipotálamo.

Mutações ativadoras causam excesso de secreção de insulina e mutações inibidoras dessa enzima causam diabetes neonatal permanente nos recém-nascidos homozigóticos. Até o momento 5 mutações foram descritas no gene da glucoquinase (**De Lonlay et al., 2005**). Este tipo de CHI também apresenta repercussão clínica leve com episódios pós-prandiais de hipoglicemia, sintomas tardios (em crianças maiores) e resposta positiva ao tratamento com diazóxido.

4) Hiperinsulinismo da 3-hidroxiacil - Coenzima A desidrogenase de cadeia curta (SCHAD – CHI)

Em recém-nascidos com hiperinsulinismo congênito, foi identificada uma mutação, com herança autosômica recessiva, no gene *HADHSC* do cromossomo 4q, que codifica a enzima mitocondrial *SCHAD*. Esta enzima atua no metabolismo das células β , das células musculares cardíacas e nos hepatócitos catalizando a penúltima reação de beta-oxidação dos ácidos graxos na mitocôndria (**Molven et al., 2004; Hussain et al., 2005**).

Recentemente, **Hardy et al., 2007** num estudo de genômica funcional das células β pancreáticas, cujo objetivo foi encontrar novos genes envolvidos na secreção de insulina, utilizou RNA e cDNA *microarrays* para identificar genes com expressão anômala em modelos animais com secreção alterada de insulina. Os resultantes perfis de expressão gênica foram submetidos à análise computacional cujo resultado revelou 373 genes potencialmente relacionados à regulação da secreção de insulina.

Utilizando RNA i (RNA de interferência) que inibe a expressão de genes específicos e portanto funciona como o controle de qualidade do *microarray* por ser muito mais específico e sensível, foram selecionados 10 genes entre os 373, mas apenas 4 genes entre estes 10 são essenciais para a secreção normal de insulina. Entre estes 4 genes está o *HADHSC* que codifica a enzima SCHAD. Através da supressão da expressão gênica (perda da função) do gene *HADHSC* em células de insulinoma utilizando RNA de interferência foi constatado um acentuado aumento na secreção de insulina (**Hardy et al., 2007**).

5) Hiperinsulinismo relacionado às alterações congênitas da glicosilação

As alterações congênitas da glicosilação são desordens metabólicas herdadas causadas por defeitos na glicosilação das proteínas com alteração na biosíntese de diversas glicoproteínas com conseqüentes sintomas de múltiplos órgãos. O hiperinsulinismo, nestas condições, está associado à hipoglicosilação do receptor da sulfoniluréia (SUR 1) que forma o canal K^{ATP} (**Sund et al., 2001; Dunne et al., 2004**).

2.4 Aspectos epidemiológicos

A maioria dos casos de CHI é esporádica, porém as formas familiares, apesar de raras, foram bem documentadas. Os primeiros casos familiares foram descritos entre judeus Ashkenazi (**Nestorowicz et al., 1996**).

Diversos países desenvolveram estudos com seus pacientes e demonstraram que os casos esporádicos do CHI ocorrem, a nível mundial, com uma freqüência que varia de 1 / 27.000 nascidos vivos na Irlanda (**Glaser et al., 2000**) a 1 / 50.000 nascidos vivos na Finlândia (**Otonkoski et al., 1999; Glaser et al., 2000**), na Espanha (**Fernández-Marmiesse et al., 2006; Guerrero-Fernández et al., 2006**), na Itália (**Biagiotti et al., 2007**), na Austrália (**Jack et al., 2000**), e no Japão (**Tanizawa et al., 2000; Ohkubo et al., 2005; Taguchi et al., 2007**).

Em algumas populações isoladas da Finlândia foram referidas formas familiares com taxas de 1 / 3.200 (**Reimann et al., 2003**), e taxas ainda maiores de 1 / 2.500 nascidos vivos foram reportadas em áreas geográficas de alta consangüinidade como na Arábia Saudita (**Thomas et al., 1995**). O mapeamento do hiperinsulinismo congênito relacionado a presença de mutações nas proteínas dos canais K^{ATP} no cromossomo 11p, conferiu a oportunidade de estabelecer o grau de homogeneidade genética das formas familiares em diferentes grupos étnicos (**Glaser et al., 1994; Thomas et al., 1995; Nestorowicz et al., 1997**).

2.5 Aspectos clínicos e diagnósticos do CHI

2.5.1 Critérios diagnósticos clínico-laboratoriais (**Dunne et al al., 2004**)

Os critérios diagnósticos clínico-laboratoriais em amostra de sangue periférico do pacientes com CHI são:

- 1) Hipoglicemia (glicemia < 48-50 mg/dl) associada a doses de reposição de glicose > 6 – 8 mg / kg / min para manter os níveis de normoglicemia
- 2) Hiperinsulinemia (insulina plasmática > 5 µ U / ml com glicemia < 50 mg/dl) ou insulina em níveis normais porém com supressão inadequada da insulina na vigência de hipoglicemia
- 3) Baixa concentração plasmática de ácidos graxos livres (< 1,5 mmol / l) que reflete a inibição da lipólise pelo excesso de ação da insulina
- 4) Baixa concentração plasmática de corpos cetônicos (beta-hidroxibutirato < 2,0 mmol / l) que reflete a baixa concentração de ácidos graxos livres
- 5) Ausência de cetonúria
- 6) Resposta glicêmica positiva > 30 mg / dl após infusão intravenosa de 1 mg de glucagon ou de 0,03 mg/kg durante a hipoglicemia (teste do glucagon)

O diagnóstico clínico do (CHI) depende dos sintomas e do resultado dos exames bioquímicos durante a hipoglicemia. O índice de suspeita clínica deve ser alto em recém-nascidos inadequados para a idade gestacional (grandes ou pequenos), recém-nascidos expostos a stress perinatal e recém-nascidos de famílias com história de hiperinsulinismo congênito. Os recém-nascidos com CHI são geralmente macrosômicos ao nascer e podem apresentar movimentos anormais, tremor, hipotonía, cianose ou hipotermia. Foram relatadas ainda alterações como dismorfismo facial com testa alta, nariz largo e bulboso com coluneta curta e lábio superior fino (*De Lonlay- Debene et al., 1999; De Lonlay et al., 2002*). Na maioria dos

recém-nascidos os episódios convulsivos conseqüentes à hipoglicemia são os sintomas mais freqüentes e mais precoces.

As crianças recém-nascidas com CHI apresentam hipoglicemia severa e persistente que se manifesta através de crises convulsivas, letargia, apnéia e outros sintomas resultantes de neuroglicopenia, associados a necessidades crescentes de glicose maiores do que 6-8 mg/kg/min (**Dunne et al., 2004**). Os níveis plasmáticos de insulina raramente estão muito elevados, porém há supressão inadequada da insulina durante concentrações baixas de glicose plasmática.

O diagnóstico do CHI está, mais frequentemente, associado à evidência da ação excessiva da insulina, como a baixa concentração dos níveis séricos de ácidos graxos livres e de corpos cetônicos (beta-hidroxibutirato).

O excesso de ação da insulina também provoca resposta glicêmica plasmática maior do que 1,7 mmol / l (30 mg / dl) após a administração de 1 mg ou 0,03 mg/kg de glucagon intravenoso durante a hipoglicemia (teste do glucagon), muito útil na confirmação do diagnóstico. O glucagon é um hormônio secretado pelas células α das ilhotas de Langerhans do pâncreas e seu efeito principal é o de estimular a glicogenólise no fígado transformando glicogênio em glicose e aumentando a glicemia. A resposta positiva ao teste do glucagon indica que a via hepática funciona, porém a glicogenólise não ocorre devido à ação inibidora da insulina. Testes adicionais para as formas específicas do hiperinsulinismo congênito incluem níveis plasmáticos de amônia (*GDH – CHI*), níveis plasmáticos de 3-hidroxibutiril – carnitina (*GK – CHI*) e níveis urinários de 3-hidroxiglututarato (*SCHAD – CHI*) (**De Lonlay et al., 2002**).

Os testes de resposta aguda de insulina (AIR) medem a resposta dos níveis de insulina plasmática após administração de diversas substâncias e foram utilizados para distinguir as formas focal e difusa do CHI. Os AIR consistem na infusão de substâncias via um cateter intra-arterial nos ramos arteriais celíaco, esplênico, da mesentérica superior e das artérias gastro-duodenais, amostras de sangue são então coletadas e medidos os níveis de glicose e de insulina (**Stanley et al., 2004**).

Crianças com K^{ATP} – CHI apresentam respostas positivas anormais à administração de cálcio (excessivas em um único ramo arterial na forma focal e excessiva em todos os ramos arteriais na forma difusa) à administração de cálcio, respostas negativas anormais à administração de antagonistas dos canais K^{ATP} como a tolbutamina e ausência de resposta (resposta nula) à administração de glicose (**Stanley et al., 2004**).

Crianças com GDH – CHI apresentam resposta aguda de insulina (AIR) positiva com a administração de leucina, um aminoácido que estimula o metabolismo da GDH (**Dunne et al., 2004**) portanto a resposta à leucina é usada para diferenciar K^{ATP} – CHI e GDH – CHI .

Na maioria dos casos, recém-nascidos com K^+ / ATP – CHI apresentam macrossomia com peso aumentado para a idade gestacional devido ao estímulo do crescimento fetal intra-uterino causado pelo excesso de insulina.

Testes genéticos, para diagnóstico pré-natal ou triagem genética, estão disponíveis comercialmente nos EUA para os 5 genes associados ao hiperinsulinismo congênito : os genes *ABCC8* e *KCNJ11* das proteínas que formam os canais K^{ATP} , o gene *GLUD-1*(GDH – CHI), o gene *GCK* (GK – CHI) e o gene *HADH* (*SCHAD* – CHI).

2.5.2 Diagnóstico diferencial das formas difusa e focal do CHI-K^{ATP}

Nos últimos anos, estudos têm tentado buscar novos métodos diagnósticos para diferenciar as formas difusa e focal do hiperinsulinismo congênito associado aos canais de potássio ATP dependentes, em virtude da possibilidade de cura cirúrgica da forma focal, pois ambas as formas são clinicamente indistinguíveis, e os testes de resposta aguda de insulina (AIR) são muito complicados, invasivos e difíceis de executar.

Outras abordagens diagnósticas intervencionistas, tecnicamente difíceis, para coletar amostras de insulina da veia porta, obtidas por via trans-hepática, ou a própria cálcio-estimulação seletiva da secreção de insulina com injeção de cálcio pela artéria pancreática e coleta de amostras de sangue pela veia hepática, não obtiveram sucesso na localização precisa do foco adenomatoso na forma focal do CHI (**Stanley et al., 2004; Giurgea et al., 2005**).

Desde a década de 1990 sabe-se que as células neuro-endócrinas captam e descarboxilam precursores aminoácidos como a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que é captada pelas células β e descarboxilada em dopamina (**Sundin et al., 2004**).

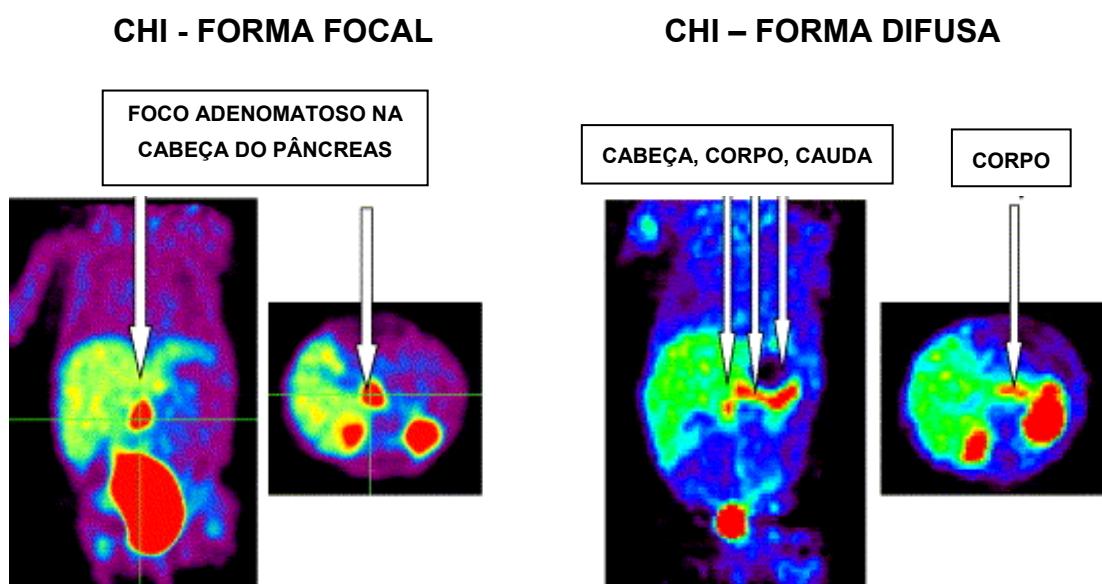
Através destes estudos foi possível desenvolver, mais recentemente, uma nova técnica diagnóstica, não invasiva, para diferenciar as formas difusa e focal do CHI, através do mapeamento com tomografia por emissão de pósitrons (PET scan) usando fluorine - 18 L - 3,4 - dihidroxi - fenilalanina (18F - fluoro - L - DOPA).

Estudos posteriores utilizando imuno-histoquímica confirmaram a presença de DOPA descarboxilase no pâncreas e demonstraram que a

administração do inibidor da enzima elimina sua captação (**De Lonlay et al., 2006**).

O acúmulo local de ¹⁸F-fluoro-L-DOPA e o registro das imagens com PET ou ressonância nuclear magnética (RNM) permitem identificar a localização anatômica da lesão na forma focal. O acúmulo difuso de ¹⁸F-fluoro-L-DOPA é consistente com a forma difusa do CHI (**Hussain et al., 2006; Ribeiro et al., 2007**).

Atualmente considera-se o escaneamento do pâncreas com tomografia por emissão de pósitrons (PET scan), utilizando ¹⁸-F-fluoro-L-DOPA, indispensável para o diagnóstico diferencial pré-cirúrgico entre as formas difusa e focal (**Hardy et al., 2007; Ribeiro et al., 2007; Subramaniam et al., 2007; Kapoor et al., 2008**).



Giurgea et al., Archives de Pédiatrie 2005;12:1628-35.

Figura 1: ¹⁸F-fluoro-L-Dopa-PET-CT scan

2.6 Aspectos terapêuticos

2.6.1 Tratamento clínico

Os pacientes com hiperinsulinismo congênito devem ser submetidos a uma abordagem multidisciplinar rápida e imediata, cujo primeiro procedimento deve ser a correção da hipoglicemia, com o objetivo de prevenir o dano cerebral e o retardado do desenvolvimento neuro-psico-motor, mantendo os níveis plasmáticos de glicose acima de 3,9 mmol / l (70 mg / dl). Um acesso venoso deve ser instalado, considerando-se que crianças com CHI podem necessitar de infusões de glicose de até 20-30 mg / kg / min.

Uma vez que o diagnóstico de CHI foi estabelecido, deve-se iniciar o tratamento com o diazóxido em doses de 5 mg / kg / dia por via oral 1 vez ao dia (*De León & Stanley, 2007*) ou 15 mg / kg / dia por via oral 3 vezes ao dia (*Giurgea et al., 2005*). Como o diazóxido é um inibidor dos canais de potássio ATP dependentes, sua resposta terapêutica requer canais funcionantes, e por tal razão muitos pacientes com K^{ATP} – CHI não respondem à terapêutica. As crianças com GDH – CHI, GK – CHI, SCHAD – CHI e com hiperinsulinismo perinatal stress-induzido respondem ao tratamento com diazóxido.

A eficácia do tratamento com o diazóxido é definida como a completa normalização dos níveis de glicose sérica (> 70 mg / dl) medidos antes e após cada refeição, em pacientes alimentados normalmente, após a interrupção da administração intravenosa de glicose ou de qualquer outra

medicação por pelo menos 5 dias consecutivos (*De Lonlay et al., 2002*), considerando a ausência de resposta ao diazóxido quando 02 amostras de sangue apresentam níveis de glicose menores do que 70 mg / dl no período de 24 horas de tratamento.

O efeito colateral do diazóxido nos recém-nascidos é a retenção hídrica, devendo ser considerada a administração de diuréticos, especialmente em crianças recebendo glicose por acesso venoso. A meia vida do diazóxido, em crianças, situa-se entre 9,5 e 24 horas e a resposta ao medicamento deve ser avaliada no mínimo após 5 dias de tratamento. O sucesso da resposta terapêutica é considerado mantendo-se a glicose plasmática acima de 3.9 mmol / l (70 mg / dl) após a alimentação (*De León & Stanley 2007*).

A segunda escolha para as crianças que não respondem ao tratamento com diazóxido é o uso de octreotide, uma substância análoga à somatostatina porém de longa duração, que inibe a secreção de insulina através da indução da hiperpolarização das células β com consequente inibição direta dos canais de cálcio voltagem-dependentes. O octreotide é administrado em subcutâneo a cada 6 a 8 horas em doses de 5 a 20 μ g / kg / dia, ou em infusão contínua (*De León & Stanley, 2007*).

A resposta inicial ao tratamento é boa na maioria dos recém-nascidos com hiperinsulinismo congênito, porém a terapia é inadequada para uso de longa duração.

O uso de bloqueadores dos canais de cálcio foi proposto como uma alternativa aos pacientes que não respondem ao diazóxido. Foram relatados

alguns poucos casos de sucesso do tratamento com nifedipina (*De Leon & Stanley, 2007*), porém não há estudos a longo prazo e muitos não obtiveram sucesso com este tratamento.

Glucagon dado em infusão intravenosa contínua (1 mg / dia) pode ajudar a manter a glicemia em crianças que aguardam a cirurgia.

Tratamento clínico (*De León & Stanley, 2007 - revisão*) :

- 1) Infusão intravenosa de glicose: dextrose de emergência 0,2 g / kg (2 ml / kg de dextrose a 10%).
- 2) Diazóxido: 5 – 15 mg / kg / dia via oral divididos em 2 doses (efeitos colaterais incluem retenção hídrica e hipertrofia).
- 3) Octreotide: 5 – 20 μ g / kg / dia via subcutânea divididos em 3 ou 4 doses (efeitos colaterais incluem diarréia, desconforto abdominal e cálculos biliares).
- 4) Glucagon: 1 mg / dia em infusão endovenosa contínua (efeitos colaterais incluem vômitos e hipoglicemias rebote após interrupção).

2.6.2 Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico, principalmente no hiperinsulinismo congênito associado aos canais K^{ATP} requer uma abordagem multidisciplinar que envolve endócrino-pediatras, radiologistas intervencionistas, patologistas e cirurgiões pediátricos experientes com o CHI.

É consenso que a abordagem cirúrgica somente deve ser realizada quando está claro que a hipoglicemia não pode ser controlada pela medicação associada à dieta.

Antes da cirurgia, idealmente deverá ser realizada uma abordagem sistemática visando a diferenciação entre as formas focal e difusa e a identificação da localização anatômica das lesões focais. Associado ao exame de tomografia por emissão de pósitrons com 18F-fluoro-L-DOPA, o exame intra-operatório de congelação mostrou ser útil na identificação das lesões focais e no direcionamento da extensão da cirurgia (**Suchi et al., 2004**), podendo prevenir as complicações resultantes de uma pancreatectomia quase-total desnecessária. O uso da laparoscopia para localizar e enuclear lesões focais, apesar de limitado a alguns casos, é uma abordagem nova e promissora (**De Vroede et al., 2004**). Crianças com a forma difusa normalmente necessitam de pancreatectomia quase-total (95% a 98%) para controlar o hiperinsulinismo, e alguns destes pacientes que persistem com hipoglicemia severa pós-cirúrgica requerem ampliação adicional da ressecção pancreática prévia.

Um estudo baseado na revisão da literatura (**Shilyansky et al., 1997**) refere resolução da hipoglicemia em 119 de 220 pacientes (54%) após pancreatectomia subtotal menor de 95%, em 53 de 83 pacientes (64%) após ressecção quase-total de 95% e em 72 de 74 pacientes (97%) após pancreatectomia quase-total de 98%.

Ainda segundo revisão de **Shilyansky et al., 1997**, foram propostas 3 estratégias terapêuticas para evitar o possível desenvolvimento de diabetes em decorrência da cirurgia: 1) tratamento não-cirúrgico utilizando nutrição parenteral de longo prazo, alimentação contínua com tubo gástrico e injeções de octreotide (**Glaser et al., 1999**) que segundo esses autores pode evitar a pancreatectomia em 50% das crianças; ou tratamento prolongado (**Mazor-Aronovitch et al., 2007**) com diazóxido e alimentação freqüente com baixo índice protéico que segundo esses autores tratou com sucesso 9 de 15 pacientes com CHI; 2) tratamento cirúrgico com exerese de 75% do pâncreas ou exerese adicional de até 98% somente se necessário, cujo resultado esperado seria a cura da hipoglicemia com redução de 50% na incidência de diabetes tardio; 3) tratamento cirúrgico com exerese de 98% do pâncreas em todos os pacientes com remoção, isolamento e criopreservação das células β para auto-transplante com o objetivo de controlar o diabetes.

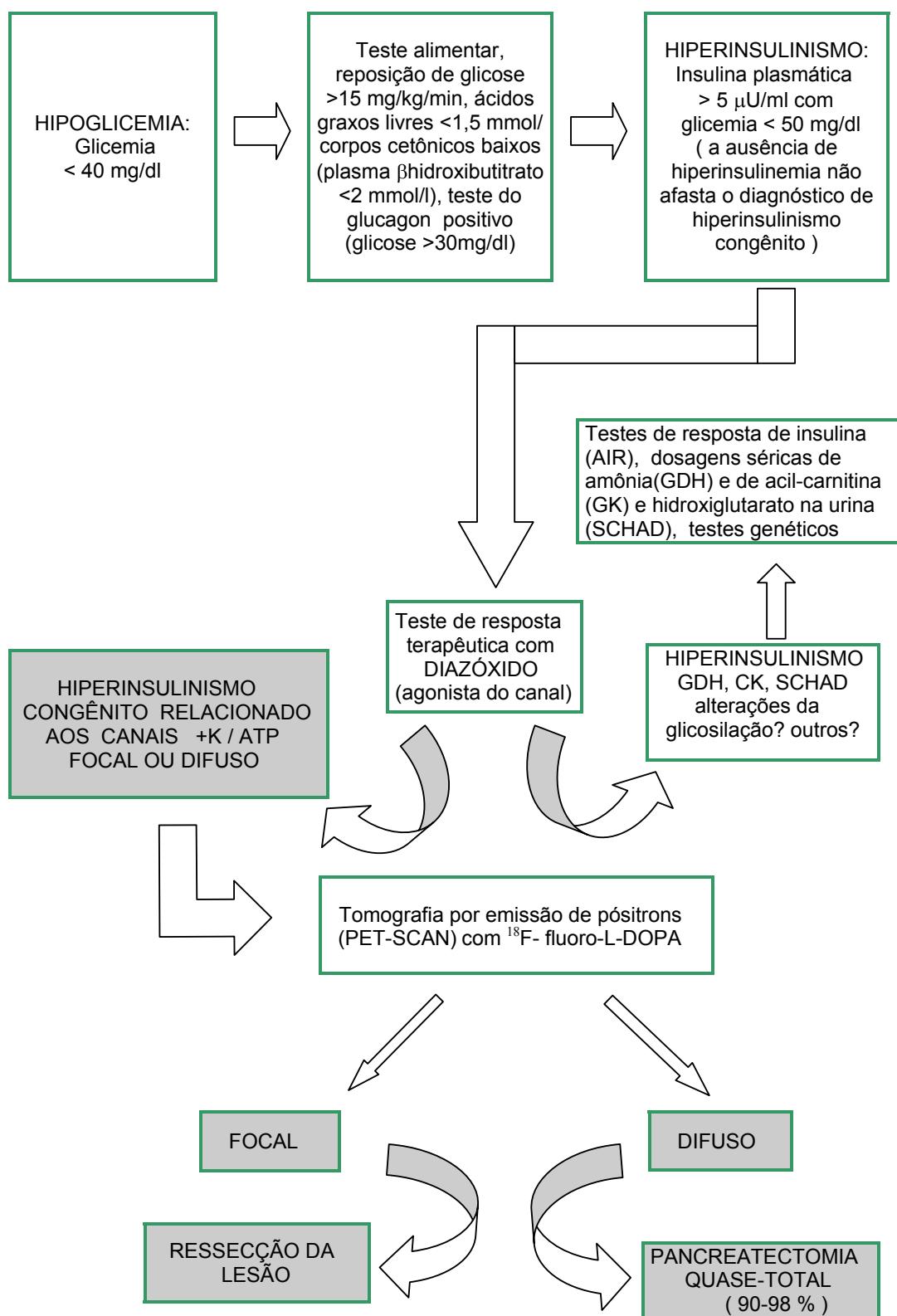


Figura 2: Esquema de conduta pediátrica na hipoglicemias neonatal.

2.7 Aspectos evolutivos e prognósticos

Dados sobre a evolução a longo prazo de crianças com CHI são escassos, porém sabemos que estas crianças apresentam risco de complicações severas inerentes à própria doença como também em consequência da terapêutica. O risco de desenvolver diabetes mellitus tem sido atribuído à pancreatectomia com uma incidência de 75% de diabetes após pancreatectomia de 95% (**Leibowitz et al., 1995**), porém mesmo pacientes que não foram submetidos à cirurgia podem desenvolver diabetes mais tarde devido ao aumento da apoptose das células β . Outro estudo (**Shilyansky et al., 1997**) evidenciou incidências de diabetes de 85% após ressecção de 99% do pâncreas respectivamente.

Portanto a incidência de diabetes parece aumentar com cirurgias mais extensas. A idade é outro fator que também está relacionado à incidência de diabetes com aumento da incidência na puberdade. Em um estudo amplo de 114 pacientes com CHI, a taxa mais alta de incidência de diabetes mellitus foi de 71% e ocorreu em crianças que foram submetidas a mais de uma ressecção cirúrgica. Neste mesmo estudo foi constatada uma alta freqüência (44%) de retardos do desenvolvimento neuro-psico-motor (**Meissner et al., 2003**).

Em outra pesquisa com 90 pacientes foi constatado que o retardamento grave é mais freqüente nas crianças com hipoglicemia neonatal do que naquelas cuja hipoglicemia ocorreu mais tarde durante a infância (**Menni et al., 2001**).

Um estudo mostrou prevalência de aproximadamente 30% de retardo do DNPM em pacientes com CHI e, aqueles que necessitaram de tratamento cirúrgico, clinicamente mais grave, tiveram uma incidência maior de problemas neuro-psico-motores do que aqueles que responderam ao tratamento medicamentoso (**Nachum et al., 2002; Steinkrauss et al., 2005**).

2.8 Aspectos embriológicos e anátomo-patológicos

O pâncreas endócrino é constituído por cerca de 1 milhão de unidades esféricas de agregados celulares, as ilhotas de Langerhans, que apresentam seu próprio suprimento sanguíneo independente, com aspecto de padrão glomerulóide medindo de 50 a 250 micrômetros no adulto, apresentando também algumas células endócrinas dispersas em pequenos ductos pancreáticos. A densidade das ilhotas difere de acordo com a região do pâncreas, sendo mais numerosas na cauda.

As células endócrinas que formam as ilhotas de Langerhans são: 1) α (secretam glucagon) predominam na periferia das ilhotas; 2) β (secretam insulina) são maiores, com mais citoplasma, localizadas na região central das ilhotas e polarizadas em direção aos capilares apresentando grande quantidade de grânulos de insulina próximos aos capilares; 3) γ (secretam somatostatina) e 4) δ (secretam substância P), estas duas últimas células são menores e estão dispersas entre as células β .

Variações fisiológicas das células β são bem conhecidas, o estado de repouso apresentando células com núcleos pequenos, ovóides e próximos entre si (*nuclear crowding*), e o estado de atividade com citoplasma aumentado e núcleos mais distantes entre si que podem ser, em adultos normais, diplóides, tetraplóides ou hexaplóides (**Ehrie et al., 1974***; **Zerbini et al., 1998**). O tamanho nuclear das células β é um bom marcador do grau de atividade destas células, um bom exemplo é o núcleo aumentado nas células β do pâncreas de recém-nascidos de mães diabéticas (**Rahier et al., 1984**; **Ariel et al., 1988**)*.

Embriologicamente, as células das ilhotas têm origem em precursores mesenquimais (stem cells) que migram para a posição extralobular, e também têm origem endodérmica a partir de múltiplos pontos ao longo do sistema túbulo-ductal exócrino onde proliferam formando agregados celulares que se destacam e migram para a posição intra-lobular.

A primeira evidência histológica da formação de ilhotas no pâncreas fetal humano ocorre entre 9 e 11 semanas de gestação, e através de marcadores imunohistoquímicos para insulina, glucagon e somatostatina pode-se visualizar células endócrinas com 8 semanas de idade gestacional (**Polak et al., 2000**).

Os dois mecanismos de formação das células β no embrião : 1) a neogênese ou diferenciação de células precursoras ductais e 2) a replicação de células β diferenciadas; são mantidos em baixos índices no período pós-natal e até mesmo no adulto. No período neonatal os altos índices de

* Apud Dunne et al., 2004

apoptose e de replicação das células β sugere uma reconfiguração do pâncreas endócrino (**Kassem et al., 2000**).

Pesquisas posteriores estenderam estes achados sugerindo que os corpos apoptóticos das células β , altamente imunogênicos, poderiam desencadear o diabetes tipo I de origem auto-imune (**Jamal et al., 2005**).

Estudos induzindo experimentalmente tanto a neogênese como a proliferação de células β diferenciadas em ratos demonstraram a capacidade regenerativa do pâncreas exócrino e endócrino após pancreatectomia de 90% (**Bouwens et al., 2005; Berrocal et al., 2005**). Estes mesmos autores demonstraram que 8 semanas após a pancreatectomia, nos 10% de pâncreas remanescente houve proliferação regenerativa de 47% da massa de células β do pâncreas total original, na primeira semana após a cirurgia a proliferação das células β estava aumentada de 3 a 5 vezes com formação maciça de novas células acinares e insulares a partir dos ductos com formação de novos lóbulos pancreáticos.

O hiperinsulinismo congênito apresenta duas formas anátomo-patológicas atualmente reconhecidas: a forma difusa e a forma focal.

A forma difusa é caracterizada por células β hiperfuncionantes difusamente distribuídas por todo o pâncreas. Esta hiperfunção é expressa morfologicamente pela presença, em 2% a 5% das células β das ilhotas de todo o pâncreas, de citoplasma amplo e núcleos anormais aumentados de volume, definidos como pelo menos 3 vezes maiores do que os núcleos das células endócrinas adjacentes (**Suchi et al., 2004**), freqüentemente resultando em núcleos gigantes e bizarros. As ilhotas de Langerhans

mostram tamanhos variáveis, algumas grandes e outras de tamanho irregular formando pequenos agregados pouco definidos de células endócrinas dispersos pelo parênquima acinar por vezes em conexão com pequenos ou grandes ductos pancreáticos (complexo dúctulo-insular).

Crianças com a forma difusa do hiperinsulinismo congênito que foram operadas após os 3 meses de idade podem apresentar ilhotas de Langerhans com a arquitetura preservada com alteração apenas nuclear e, em cerca de 30% dos recém-nascidos com a forma difusa, o pâncreas pode mostrar histologia completamente normal, independentemente da idade na época da cirurgia.

Um estudo realizado com seis recém-nascidos apresentando hiperinsulinismo congênito (**Sempoux et al., 2002**) mostrou a presença de complexos dúctulo-insulares em todos os pacientes com forma focal ou difusa. Na forma difusa foram observadas ilhotas de forma e tamanho variados como também aglomerados mal definidos e irregulares de células β distribuídos ao acaso por todo o pâncreas e ilhotas aumentadas de tamanho localizadas nos septos marginais dos lóbulos.

Na forma focal foi observado aumento focal de áreas contendo ilhotas ou aumento focal do número de células β . Na forma focal o acúmulo pouco definido de aglomerados de ilhotas desloca lateralmente o tecido acinar pancreático.

Segundo **Rahier et al., 1998** em um estudo de 20 crianças com hiperinsulinismo congênito com 1,5 a 13 meses de idade na época da cirurgia, 13 (65%) delas apresentavam a forma difusa. Em todos estes

recém-nascidos com a forma difusa e em todas as regiões do pâncreas, de 10% a 60% das ilhotas pancreáticas mostraram nucleomegalia com tamanho nuclear de até 19 μm , núcleos muito aumentados em comparação aos controles de pâncreas normal de crianças da mesma idade cujos núcleos das células β mediram de 5 a 6 μm .

O significado exato desta alteração nuclear não é claro, sabe-se que em certos tecidos, particularmente nos tecidos endócrinos, o tamanho do núcleo está ligado à função da célula (**Rahier et al., 1998**). Foi sugerido que estes núcleos anormais poderiam ser a consequência do tratamento médico (glicose, diazóxido, etc) administrado às crianças na tentativa de controlar os episódios hipoglicêmicos. Entretanto, esta hipótese foi afastada considerando-se que esta alteração nuclear (nucleomegalia) não foi observada, nas mesmas proporções, nas células β dos pacientes com a forma focal que também receberam o mesmo tratamento.

Um estudo de **Ariel et al. (1988 apud Dunne et al., 2004)**, confirmado por **Zerbini et al., 1994**, demonstrou que estes núcleos aumentados eram poliplóides, algo muito incomum nas células β do pâncreas nesta faixa etária. Entretanto, em crianças maiores e mais ainda em adultos, núcleos aumentados não são infreqüentes nas células β pancreáticas e não estão, de nenhuma forma, associados à hipoglicemia hiperinsulinêmica. Por esta razão, a observação histológica de núcleos aumentados e bizarros deve ser interpretada com cuidado fora do período neonatal e infantil, sem esquecer que núcleos anormais também são encontrados em recém-nascidos de mães diabéticas.

A forma focal consiste em uma hiperplasia adenomatosa focal confluente de células endócrinas, frequentemente menor do que 7,5 mm de diâmetro, com acúmulo de agregados de ilhotas de Langerhans que estão separados por finas rimas de células acinares ou finos septos de tecido conjuntivo. Ocasionalmente as células β podem estar aderidas a pequenos ductos formando complexos díctulo-insulares. O citoplasma das células β é normal a escasso e os núcleos são pequenos e próximos entre si (*nuclear crowding*). A área de hiperplasia adenomatosa é, na maioria dos casos, unifocal e constituída por um aglomerado de ilhotas histologicamente normais com área central de células β e rima periférica de células não- β . A lesão preserva a arquitetura lobular normal do pâncreas exceto na área de hiperplasia focal.

No estudo de **Rahier et al., 1998**, os focos adenomatosos, nos diversos pacientes, mediram de 2,5 mm a 7,5 mm nos maiores eixos (média de 4,5 mm) e nestas áreas foram observados raros núcleos anormais aumentados. O parênquima pancreático, fora das lesões focais, é normal e portanto a ausência dos núcleos anormais aumentados no pâncreas remanescente aos focos adenomatosos é um dos critérios para o diagnóstico histopatológico diferencial da forma focal em relação à forma difusa (**Sempoux et al., 2002 e 2003; Suchi et al., 2003**).

Ao contrário de um adenoma verdadeiro (insulinoma), a hiperplasia adenomatosa focal inclui células acinares exócrinas isoladas em meio à lesão (**Sempoux et al., 2003**).

Segundo **Suchi et al., 2004** num estudo com 52 crianças com idade entre 21 dias e 796 dias, 18 (34,6%) apresentaram a forma difusa, 30

(57,7%) a forma focal e 4 (7,7%) mostraram ausência de critérios diagnósticos definidos e não obtiveram classificação histológica final (equívoca). A histologia da forma focal destas crianças mostrou área de hiperplasia adenomatosa cujas células endócrinas ocupavam mais do que 40% dos lóbulos, e apenas nesta área foram observados, ocasionalmente, núcleos aumentados, enquanto que o restante do pâncreas apresentou aspecto completamente normal; diferentemente da forma difusa em que os núcleos aumentados encontravam-se dispersos por todo o pâncreas e não havia área de hiperplasia adenomatosa.

De acordo com este autor (**Suchi et al., 2004**), na forma difusa o critério para nucleomegalia é um aumento de no mínimo 3 vezes o tamanho nuclear em comparação os núcleos normais das células endócrinas adjacentes.

Assim a patogenia destas duas formas anátomo-patológicas e o tipo de tratamento de cada uma delas são fundamentalmente diferentes. Na forma focal, o hiperinsulinismo é causado pela existência de uma lesão focal consistindo em um agregado pseudo-tumoral de ilhotas chamado hiperplasia adenomatosa focal, estes casos são curados por uma pancreatectomia limitada (retirada do foco adenomatoso), desde que nenhum outro foco exista. Na forma difusa a cura depende de uma pancreatectomia subtotal ou quase total pois esta forma de hiperinsulinismo resulta de uma alteração funcional hipersecretante difusa.

Portanto é de fundamental importância a diferenciação anátomo-patológica das duas formas antes da cirurgia; primeiro, para evitar, nos pacientes que apresentam a forma focal, uma pancreatectomia quase total

desnecessária relacionada ao alto risco de diabetes e, segundo, para evitar, nos pacientes com a forma difusa, uma segunda intervenção cirúrgica considerando-se que na maioria dos casos uma pancreatectomia parcial ou subtotal é insuficiente (**Smith et al., 2001**).

Estas razões indicam a realização do exame intra-operatório de congelação que, segundo os critérios histopatológicos de **Suchi et al., 2004** acima descritos, pode direcionar a extensão da cirurgia.

Atualmente usa-se preferencialmente ao exame de congelação, a tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) com ^{18}F -fluoro-L-DOPA , ainda não disponível no Brasil, para distinguir as formas difusa e focal e identificar a localização precisa da área focal a ser retirada cirurgicamente (**Hardy et al., 2007; Ribeiro et al., 2007; Subramaniam et al., 2007; Kapoor et al., 2008**).

2.9 Aspectos imuno-histoquímicos do pâncreas endócrino

2.9.1 Proliferação das células β no CHI (perinatal e neonatal) e no pâncreas normal (gestacional e neonatal)

No pâncreas normal, os resultados imunohistoquímicos positivos para o marcador insulina no citoplasma das células β das ilhotas de Langerhans começam a aparecer a partir da oitava semana de gestação, porém, nesta época, todas as células endócrinas co-expressam insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático (**Polak et al., 2000**).

O marcador imunohistoquímico de proliferação celular Ki-67 é positivo durante todas as etapas ativas do ciclo celular, incluindo as fases G1, S, G2 e M (**Gerdes et al., 1991**), e é negativo nos núcleos das células em repouso (fase G0). Este anticorpo monoclonal reconhece proteínas que funcionam como fatores de transcrição de genes ligados à proliferação celular. Como o anticorpo Ki-67 podia ser utilizado apenas em tecido fresco ou congelado, em **1992 Gerdes et al.** desenvolveu o anticorpo monoclonal MIB-1 que possui o mesmo reconhecimento antigênico do Ki-67 e pode ser utilizado em cortes histológicos de tecido fixado em formalina e incluído em parafina.

As células β , produtoras de insulina, apresentam um índice proliferativo, aferido com o marcador nuclear Ki-67, de 5% com 8 semanas de idade gestacional caindo progressivamente para 3% com 11 semanas (**Polak et al., 2000**). Outro estudo (**Bouwens et al., 1997**) revelou um pico de 3% do índice proliferativo das células β com 14 - 16 semanas de gestação, que, nas 24 semanas seguintes, cai abruptamente para um índice muito baixo chegando a 0,1% com 38 - 40 semanas de idade gestacional.

O tecido endócrino do pâncreas fetal humano mostra seu índice de crescimento mais elevado entre a 21^a e a 40^a semanas de idade gestacional. A atividade mitótica muito baixa das células endócrinas observada durante esse período demonstra a importância da neogênese dessas células a partir de células precursoras hormônio-negativas ou stem cells localizadas nos ductos pancreáticos, e estudos comprovaram que 80% das células β de ratos tiveram origem em células precursoras e não a partir da autoreplicação (**Bouwens et al., 1997; Béringue et al., 2002**).

Outra condição fisiológica em que ocorre aumento da proliferação das células β é durante a gestação, gerando um aumento temporário de aproximadamente 50% da massa de células β da gestante. O aumento do índice proliferativo é induzido pelo lactogênio placentário e o aumento do volume celular (hipertrofia celular) ocorre como uma adaptação fisiológica. Nos primeiros 10 dias pós-parto ocorre a involução com redução do volume e da proliferação celulares e aumento da apoptose (*Miki et al., 2001; Kassem et al., 2000*).

No pâncreas das crianças com CHI, dois estudos mostram resultados diferentes. Um primeiro estudo (*Sempoux et al., 1998*) de proliferação das células β usando imuno-histoquímica de dupla marcação com insulina e Ki-67 em sete recém-nascidos de 6 meses de idade média com a forma difusa, e sete recém-nascidos de 3 meses de idade média com a forma focal, usando controles de pâncreas normais pareados por idade, mostrou que o índice proliferativo (definido como o número de células β Ki-67 positivas em 1000 células β de cada paciente) das células produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans e em pequenos agrupamentos de células endócrinas isolados ou associados aos ductos exócrinos, na forma difusa do CHI não era significativamente maior do que nos casos controle (2,94% na forma difusa versus 1,96% nos controles normais de 6 meses de idade). Porém na forma focal do CHI o índice proliferativo estava muito aumentado (7,76% na forma focal versus 1,99% nos controles normais de 3 meses de idade).

Este estudo de *Sempoux* foi fundamental no redirecionamento da pesquisa sobre o CHI, contrariando a hipótese de uma proliferação pós-natal

persistente das células β na forma difusa do CHI, e indicando a possibilidade de uma alteração funcional molecular na patogênese da forma difusa. O índice proliferativo aumentado na forma focal pode ser explicado posteriormente pelos estudos em genética molecular.

Em outro estudo (**Kassem et al., 2000**) a pesquisa imunohistoquímica de proliferação celular com dupla marcação para insulina e Ki-67 realizada com recém-nascidos, menores de 3 meses de idade na época da cirurgia, mostrou que a incidência de positividade do Ki-67 nas células β na forma difusa ($2,13\% \pm 0,46$) e na área de hiperplasia da forma focal ($5,48\% \pm 0,82$) eram significativamente maiores do que no grupo controle pareado por idade ($0,88\% \pm 0,19$) com $P < 0.05$ na forma difusa e $P < 0.01$ na forma focal.

Este autor demonstrou que pacientes e crianças controle com mais de 3 meses de idade na cirurgia, apresentaram índice proliferativo de células β menor do que aquele das crianças com menos de 3 meses de idade, porém ainda assim significativamente maior do que do grupo controle pareado por idade com $P < 0.02$ na forma difusa e $P < 0.01$ na área hiperplásica da forma focal. O índice de proliferação, nas áreas circunjacentes à área hiperplásica na forma focal, é igual ao índice proliferativo dos controles normais.

Neste estudo, a proporção de proliferação das células β nos controles normais estava significativamente correlacionada com a idade: a proliferação decresce de $3,2\% \pm 0,5$ entre a 17^a e a 32^a semanas de gestação até atingir $0,13\% \pm 0,08$ após 6 meses de idade; no período perinatal (definido como 2 meses antes e 2 meses depois do nascimento) foram observados níveis intermediários de proliferação das células β ($1,1\% \pm 0,2$).

Os mecanismos de regulação da proliferação das células β em humanos não está bem esclarecido. Em roedores, o gene *IGF-2* (Insulin-like Growth Factor 2) está elevado no feto e decresce após o nascimento, e a hiper-expressão de *IGF-2* em animais transgênicos resulta em hiperplasia das ilhotas (**Petrik et al., 1999**). Não se sabe se o mesmo mecanismo está presente nos fetos humanos, entretanto, em alguns casos da forma focal do CHI há hiper-expressão do gene *IGF-2* nas células β da área adenomatosa, associada à dissomia uniparental com duplicação do alelo paterno do qual é transcrito este gene (**Damaj et al., 2008**).

Segundo **Kassem et al., 2000**, o índice proliferativo aumentado das células β na área hiperplásica da forma focal ($5,48\% \pm 0,82$) em relação à forma difusa ($2,13 \pm 0,46$), ocorre devido à diferença genética primária entre estas duas formas histopatológicas.

Na lesão focal ocorre deleção somática de parte dos genes do cromossomo 11p do alelo materno (**Fournet et al., 2001**), sendo conhecidos pelo menos dois destes genes: *H19* e *p57*. O produto do gene *H19* é um micro RNA que atua como fator de transcrição gênica silenciando o gene *IGF-2*, exercendo sua ação como regulador dos níveis de mRNA do *IGF-2* (**Sempoux et al., 2003**). O gene *p57* é um importante inibidor de vários complexos ciclina G1/ Cdk causando parada do ciclo celular quando as células já estão diferenciadas, funcionando como um gene supressor de tumor (**Kassem et al., 2000; Suchi et al., 2006**).

A ausência dos genes no alelo materno causa desequilíbrio da expressão destes genes no alelo paterno o que pode explicar a proliferação

aumentada observada na forma focal do CHI. O esclarecimento da patogênese da forma focal do CHI foi importante pois evidenciou que estes e outros genes nesta região do cromossomo 11p15 são reguladores da proliferação das células β abrindo caminho para novos estudos no tratamento do diabetes.

2.10 Aspectos genéticos e moleculares relacionados à função e à resposta terapêutica

2.10.1 Mecanismo de secreção da insulina

A secreção da insulina pelas células β do pâncreas ocorre da seguinte forma: a glicose sérica é transportada para dentro da célula β pelo transportador de glicose (GLUT 2). No citoplasma celular, a primeira etapa do metabolismo enzimático da glicose, (glicólise) é sua fosforilação pela glicoquinase (GK) cujo produto (glicose-6-fosfato) é transportado para o interior das mitocôndrias resultando na síntese de trifosfato de adenosina (ATP) com consequente aumento da razão ATP/ADP intra-citoplasmática.

Na superfície da membrana das células β há centenas de canais de potássio ATP dependentes (**Clement et al., 1997; Aguilar-Bryan et al., 1999**) formados por duas sub-unidades protéicas : 1) Kir 6.2 que possui sítios de ligação para o ATP (trifosfato de adenosina) cuja ligação com o ATP fecha o canal o que inibe sua função; e 2) SUR 1 que possui sítios de ligação para o ADP (difosfato de adenosina) cuja ligação com o ADP abre o

canal antagonizando a inibição da função. Assim, o aumento da razão ATP/ADP, provocada pelo metabolismo da glicose, age sobre as proteínas dos canais K^{ATP} , inibindo-os, isto é, fechando estes canais e despolarizando a membrana celular.

A despolarização da membrana citoplasmática das células β provoca a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes, também situados na superfície da membrana celular, permitindo assim o influxo de cálcio. O aumento abrupto da concentração de cálcio citosólico nas proximidades da membrana celular promove então a exocitose dos grânulos de insulina próximos à membrana citoplasmática.

Entretanto, o aumento de cálcio também age despolarizando a membrana mitocondrial interna, o que inibe a produção de ATP, resultando na queda da razão ATP/ADP. Este é um dos mecanismos de feed-back através do qual o metabolismo da glicose produz oscilações na disponibilidade de ATP e ADP influenciando diretamente a atividade dos canais K^{ATP} , o potencial da membrana celular e o fechamento e a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes (**Dunne et al., 2000 e 2004**).

Os canais de potássio são, portanto, os intermediários entre o metabolismo da glicose no citoplasma celular e a subsequente resposta apropriada de secreção de insulina. Sua função é fundamental e determina tanto a primeira fase como a segunda fase da secreção de insulina. Em repouso, os canais K^{ATP} estão abertos, com potencial de membrana de aproximadamente 65 mV negativos devido à baixa razão ATP/ADP intracelular e à alta sensibilidade da sub-unidade SUR 1 do canal K^{ATP} à ligação com o ADP que mantém o canal aberto. O metabolismo da glicose produz

uma diminuição de aproximadamente 50% na concentração de ADP livre nas células β para a produção de ATP, reforçando o aumento da razão ATP/ADP e o efeito de fechamento dos canais (Bryan et al., 2004).



Sattiraiu et al., Clin Pharmacol Therap 2008;83(2):354-57.

Figura 3: Mecanismo de secreção de insulina na célula β : a glicose entra na célula através do transportador Glut 2, é metabolizada em glicose-6-fosfato ($-P$) produzindo aumento da razão ATP/ADP. O ATP em níveis aumentados se liga aos canais de potássio ATP dependentes (KATP) → fechamento dos canais → o K^+ não pode sair → acúmulo intra-cellular de íons positivos → despolarização da membrana citoplasmática → abertura dos canais de cálcio voltagem dependentes → Ca^{++} entra no citoplasma → exocitose dos grânulos de insulina. Em pacientes com hiperinsulinismo congênito (HHI) mutações inativam os canais que permanecem fechados → secreção constante de insulina, e em pacientes com diabetes mellitus neonatal (NDM) mutações ativam os canais que permanecem abertos → ausência de secreção de insulina.

Estes eventos descrevem a chamada secreção de insulina estimulada pela glicose (*GSIS – Glucose-Stimulated Insulin Secretion*) dependente do canal K^{ATP} e do influxo de cálcio ou primeira fase, que corresponde à secreção dos grânulos de insulina pré-formados localizados próximo à membrana citoplasmática. Entretanto, existem diferentes grupos de grânulos de insulina nas células β , desde os de reserva até os imediatamente secretáveis (**Henquin et al., 2000; Bratanova-Tochkova et al., 2002**).

A segunda fase da secreção de insulina ocorre através do progressivo aumento e potencialização do gatilho do influxo do cálcio promovendo a preparação, o recrutamento e o transporte de novos grupos de grânulos para a exocitose. Esta fase, também chamada fase de amplificação é referida como “*GSIS independente do canal K^{ATP}* ”, pois depende da presença crescente de cálcio intra-citoplasmático (**Straub et al., 2001**).

Recentemente **Geng et al., 2003** mostraram que a fase de amplificação ou segunda fase de secreção de insulina não é independente dos canais K^{ATP} , ao contrário, depende dos canais K^{ATP} existentes na membrana dos grânulos contendo insulina. Este estudo revelou que existe maior concentração de canais K^{ATP} na superfície da membrana dos grânulos de insulina do que na superfície da membrana citoplasmática das células β pancreáticas. Esta descoberta inédita abre novos caminhos para o desenvolvimento de medicamentos anti-diabéticos ou mesmo anti-hiperinsulinêmicos mais seletivos que ajam diretamente sobre a membrana dos grânulos de insulina e não somente nos canais K^{ATP} da membrana

celular. O medicamento hipoglicemiante glibenclamida, usado no diabetes mellitus, distingue-se das outras sulfoniluréias por sua superior eficácia secretória, porém somente com a pesquisa de **Geng et al., 2003** descobriu-se que esta eficácia se deve a sua capacidade de ligação com os canais K^{ATP} dos grânulos.

Os mecanismos moleculares do metabolismo desta fase são complexos e estão sendo estudados, pesquisas mostraram que o próprio ATP apresenta, entre outras funções, a função de mediador local no mecanismo de transporte, recrutamento e exocitose dos grânulos através da regulação das ATPases, da fosforilação de proteínas específicas e da ativação de proteinoquinases e quinases dependentes de cálcio/calmodulina como ocorre na secreção de outros hormônios, de neuropeptídeos e de neurotransmissores.

Assim, atualmente sabe-se que tanto a primeira como a segunda fase da secreção de insulina dependem dos canais K^{ATP}, porém a primeira fase depende dos canais da membrana das células β e a segunda dos canais da membrana dos grânulos de insulina.

Portanto os canais K^{ATP} são determinantes na secreção de insulina regulada pela glicose, e este fato é de importância fundamental na compreensão da patogenia do hiperinsulinismo congênito e de outros distúrbios mais comuns como o diabetes, como também no desenvolvimento da manipulação farmacológica da secreção de insulina.

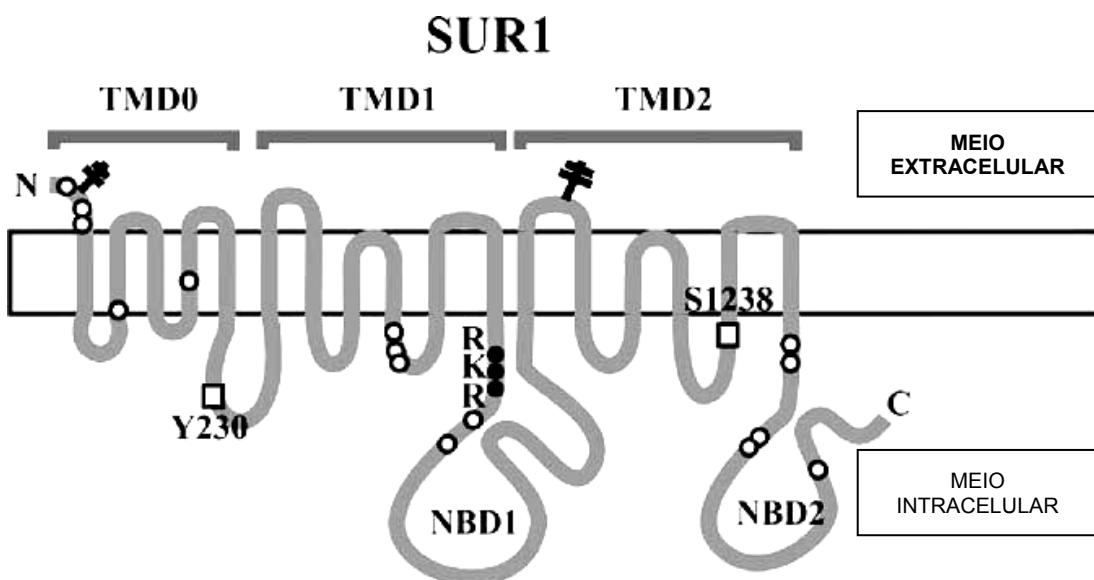
2.10.2 Estrutura e função dos canais iônicos de membrana K^{APT} das células β

As células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas apresentam, na superfície da membrana citoplasmática, canais de potássio dependentes de ATP que funcionam através de receptores específicos que são proteínas da membrana celular que formam um complexo funcional octamérico constituído por dois tipos de sub-unidades proteicas: SUR 1 (*sulfonylurea receptor*) cujo nome deriva de sua alta afinidade à sulfoniluréia (**Aguilar-Bryan et al., 1995**), e Kir 6.2 (*inwardly rectifying potassium channel*).

As subunidades SUR 1 são homólogas a vários membros de uma superfamília de proteínas conhecida como “*ATP binding cassette superfamily*”, são constituídas por 1581 aminoácidos e 39 exons, e apresentam 3 domínios transmembrana : TMD-0, TMD-1 e TMD-2 (*Transmembrane Domain*), 9 alças citoplasmáticas : CL-1 a CL-9 (*Cytoplasmic Loops*) e 2 sítios intra-celulares para ligação do ATP : NBF-1 e NBF-2 (*Nucleotide Binding Fold 1 e 2*) (**Thomas et al., 1996**). O domínio transmembrana TMD-0 é o responsável pela associação e ligação entre as subunidades SUR 1 e Kir 6.2, fundamental na modulação de abertura e fechamento do canal e no trânsito do canal do retículo endoplasmático até a membrana celular, pois a migração até a superfície não ocorre se as sub-unidades protéicas estiverem separadas (**Chan et al., 2003**).

As subunidades Kir 6.2 são retificadores fracos da entrada do potássio, são constituídas por 390 aminoácidos e apenas 1 exon, e sua topologia na membrana celular possui 2 domínios alfa-hélice transmembrana ligados por

uma seqüência altamente conservada de aminoácidos (domínio filogeneticamente preservado em várias espécies) homóloga ao domínio de seletividade dos canais de potássio voltagem dependentes de outros tecidos.



Yan et al., Diabetes 2007 Sept;56(9):2339–48.

Figura 4: Subunidade proteica SUR1 com os 3 domínios transmembrana (TMD), o local responsável pela retenção no retículo endoplasmático (RKR), os 2 sítios de ligação do ATP (Nucleotide Binding Domains NBD1/NBD2) e a localização das mutações em pacientes com CHI (O e □).

Os canais K^{ATP} também estão presentes no músculo cardíaco e em outros músculos lisos, porém como complexos hetero-multiméricos de diferentes proteínas SUR-x e Kir 6.x (**Aguilar-Bryan et al., 1999**). No pâncreas, cada canal K^{ATP} é formado por um complexo octomérico (oito subunidades) constituído por 4 subunidades Kir 6.2 organizadas ao redor de um poro central, acopladas a 4 subunidades SUR 1 (**Clement et al., 1997**; **Shyng et al., 1998**), porém cada subunidade é diferentemente regulada.

A subunidade Kir 6.2 é inibida pelo ATP e ativada pela acetyl-CoA e pelos lípides fosfositídeos, e determina as propriedades biofísicas do canal que incluem a seletividade, a retificação e a barreira para o transporte de potássio. O fechamento do canal induzido pelo ATP envolve os domínios citoplasmáticos do Kir 6.2, porém há evidências que a ação do ATP pode ser quase completamente inibida por mutações em outros sítios (extra-citoplasmáticos) do Kir 6.2 (**Thomas et al., 1996; Huopio et al., 2002; Efrat et al., 2004; Ashcroft et al., 2007**).

A subunidade SUR 1 age como um regulador de condutância do Kir 6.2, e a sensibilidade dos canais ao ATP, ao ADP e aos nucleotídeos de guanosina (GTP e GDP) envolve ambas as subunidades. Dos dois sítios intra-celulares do SUR 1 para ligação do ATP, o mais importante é o NBF-2 pois possui atividade ATPase, e as mutações genéticas encontradas nesta região (NBF-2) levam a perda da função do canal (**Thomas et al., 1996**).

Portanto a regulação funcional dos canais K^{ATP} induzida pelas alterações na razão ATP/ADP envolve interações cooperativas dos nucleotídeos em ambas as sub-unidades com a ação inibitória do ATP sobre a Kir 6.2 sendo regulada pelos efeitos ativadores do ADP sobre a SUR 1.

Cada subunidade dos canais K^{ATP} possui um número de motivos de sinalização que permite sua configuração na estrutura do canal e sua expressão na superfície celular. Um destes motivos, que ocorre em ambas as subunidades, é chamado RKR sendo composto por três aminoácidos arginina-lisina-arginina e age como uma seqüência de sinalização de retenção, do canal recém-formado, dentro do retículo endoplasmático.

Portanto, este motivo RKR precisa tornar-se não exposto (oculto) na configuração tridimensional da estrutura proteica do canal (**Mikhailov et al., 2005**), para que este possa migrar através do citoplasma até a superfície da membrana celular. O RKR está localizado próximo ao NBF-1 da proteína SUR 1 nos aminoácidos 648-650 e próximo a região terminal COOH do Kir 6.2 nos aminoácidos 369-371. Mutações nestas regiões produzem a ausência da expressão dos canais na superfície da membrana celular. (**Zerangue et al., 1999; Cartier et al., 2001; Partridge et al., 2001; Yan et al., 2007; Sivaprasadarao et al., 2007**).

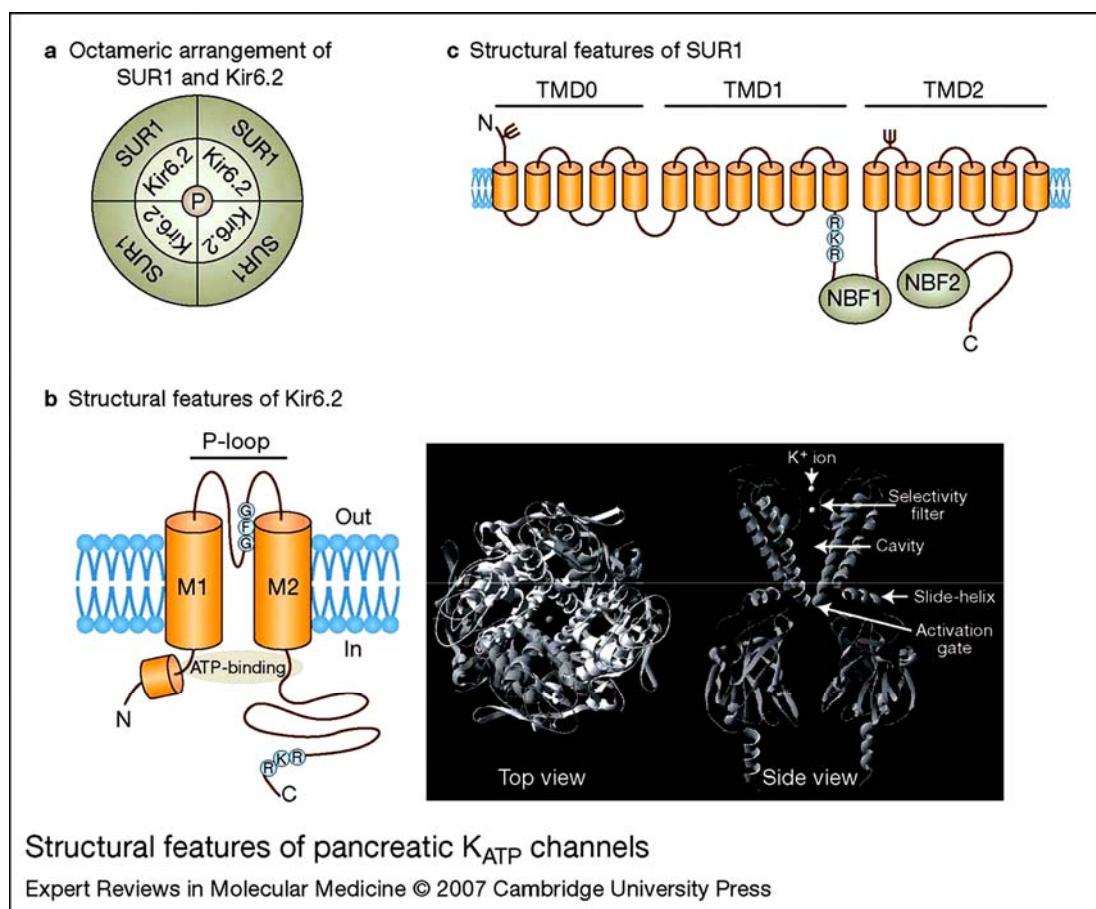


Figura 5: Características estruturais dos canais K_{ATP} das células β .

2.10.3 Mutações nos genes *ABCC8* (SUR 1) e *KCNJ11* (Kir 6.2) dos canais de membrana K^{ATP}

A maioria dos casos de hiperinsulinismo congênito (>95%) é esporádica, porém casos familiares foram também descritos e a análise de segregação foi consistente, na maioria das famílias, com modo de herança autossômico recessivo (**Glaser et al., 1990**).

Os estudos mostram que em 33% a 50% de todos os pacientes com hiperinsulinismo congênito, nenhuma mutação foi identificada nos genes das proteínas SUR 1 e Kir 6.2 dos canais K^{ATP} (**De Lonlay et al., 2002; Suchi et al., 2003; Tornovsky et al., 2004; Hussain et al., 2005; Fernández-Marmiesse et al., 2006**). Esta alta percentagem de achados negativos sugere a necessidade de ampliar a pesquisa genética, incluindo investigação dos promotores e fatores de transcrição dos genes *ABCC8* e *KCNJ11*, pesquisa de deleções heterozigóticas, estudos de variação funcional dos íntrons, procura por mutações em outros genes e validação metodológica.

Raras famílias apresentam um modo de herança autossômico dominante (**Thornton et al., 2003; De Lonlay et al., 2005**) que ocorre na infância, sempre sob a forma difusa, clinicamente pouco grave e sensível ao tratamento com diazóxido.

O gene *ABCC8* da subunidade protéica SUR1 foi o primeiro gene supostamente envolvido com o hiperinsulinismo congênito e foi identificado por **Glaser et al., 1994** e **Aguilar-Bryan et al., 1995**. As primeiras mutações associadas ao CHI foram identificadas na região NBF-2 do gene *ABCC8*

(*Thomas et al., 1995*) e subsequentemente foram descritas novas mutações ao longo deste gene. O gene da subunidade protéica Kir 6.2 foi seqüenciado pela primeira vez por *Inagaki et al., 1995*, em uma criança iraniana com a doença, filha de pais consanguíneos.

Uma revisão atual (*Gloyn et al., 2006*) (**ANEXOS A e B**) descreve as mutações dos genes *ABCC8* e *KCNJ11* e a confirmação de seu efeito através de estudos que comprovaram a ausência de função dos canais.

Alterações genéticas nestes genes causam tanto hiperinsulinismo (mutações mais freqüentes no SUR 1) como diabetes mellitus neonatal (mutações mais freqüentes no Kir 6.2) (*Grimberg et al., 2001; Marthinet et al., 2005; Greer et al., 2007*). Alterações genéticas em outros genes cujas proteínas controlam o metabolismo intracelular da glicose, como nos genes das enzimas glucoquinase (GK), glutamato desidrogenase (GLUD 1) e short-chain L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (SCHAD) ou ainda no gene receptor de insulina humana também são causas, menos freqüentes, de hiperinsulinismo ou diabetes.

O hiperinsulinismo congênito (CHI) é mais frequentemente causado por mutações nos genes *ABCC8* (SUR 1) e *KCNJ11* (Kir 6.2), localizados no braço curto do cromossomo 11 (locus 11p 14-15.1) (*Giurgea et al., 2006*). Estas mutações levam à perda da função dos canais K^{ATP} através de diferentes mecanismos: alterando desde a densidade do canal, a expressão do canal, o transporte do canal do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático para a superfície da membrana citoplasmática, como também alterando as propriedades de ligação do canal com diversas

moléculas e a atividade do canal em resposta às variações nas concentrações de nucleotídeos intra-celulares (**Faye-Peterson et al., 2002; Fournet et al., 2004**). Estudos funcionais com células β pancreáticas, isoladas de pacientes com hiperinsulinismo congênito, demonstraram que a perda funcional dos canais K^{ATP} resulta em células β constantemente despolarizadas com consequente irregularidade da atividade dos canais de cálcio (**Matsuo et al., 2000; Muzyamba et al., 2007**).

A subunidade SUR 1 determina um papel chave na regulação farmacológica dos canais K^{ATP} . As drogas agonistas, isto é, que abrem os canais K^{ATP} (*KCOs – Potassium Channel Openers*) como o diazóxido e outros fármacos menos seletivos, se ligam ao SUR 1 ativando os canais de forma nucleotídeo-dependente. Duas seqüências de nucleotídeos do SUR 1 são fundamentais para determinar a ligação e a ativação dos canais e estão localizadas nas séries finais das hélices transmembrana nos aminoácidos 1059-1087 (*KCO1*) e 1218-1320 (*KCO2*) (**Thomas et al., 1996**). Isto explica porque pacientes com formas de hiperinsulinismo congênito que não possuem mutações nestas regiões, respondem ao tratamento com diazóxido (**Darendeliler et al., 2002**).

Segundo **Henwood et al., 2005** as duas mutações que foram melhor estudadas no gene da sub-unidade SUR 1 são: g 3992-9 a (intron 32) e del F1388 (exon 34), que são mutações nulas gerando canais não funcionantes, pois ambas as mutações ocorrem na região codificadora do NBF-2 (*Nucleotide Binding Fold 2*) sítio intra-celular para ligação do ATP. Estas mutações caracterizam-se pela ausência de resposta ao diazóxido,

agonista do canal, e pela ausência de secreção de insulina em resposta à administração de tolbutamina, um antagonista do canal.

Estes autores (**Henwood et al., 2005**) examinaram fenótipos de outras mutações relacionadas aos canais de potássio, medindo a resposta aguda de insulina (AIR) secundária à administração de diversas substâncias (cálcio, leucina, glicose e tolbutamina) em crianças com mutações recessivas *ABCC8* ou *KCNJ11* expressas como CHI difuso ($n = 8$) ou CHI focal ($n = 14$). Do total de 24 mutações encontradas, pelo menos 7 mostraram evidências de função residual do canal K^{ATP} com (AIR) positiva à tolbutamina ou à leucina, e um dos pacientes respondendo ao tratamento com o diazóxido, agonista do canal. Seis dos sete pacientes com disfunção parcial tinham substituições de aminoácidos ou inserções, enquanto que o último paciente era heterozigoto composto para dois *stop codons* prematuros. Estes resultados indicam que algumas mutações dos canais K^{ATP} podem causar canais parcialmente funcionantes, incluindo casos que são totalmente responsivos à terapia com diazóxido. Estes resultados evidenciam a complexidade da patogênese do CHI e as dificuldades do diagnóstico clínico e do tratamento e novas mutações estão constantemente sendo descobertas (**Natarajan et al., 2007**).

Existem *kits* comerciais para a pesquisa genética de 5 diferentes genes: os 2 genes do CHI relacionado aos canais K^{ATP} (*ABCC8* e *KCNJ11*) e 3 genes do CHI associado às enzimas do metabolismo da glicose (*GK*, *GLUD 1* e *SCHAD*) (**Dunne et al., 2004**).

A análise genética poderia ser útil no diagnóstico diferencial precoce entre as formas difusa e focal do hiperinsulinismo já que ambas apresentam diferentes mecanismos genéticos (**Peranteaou et al., 2006**), entretanto um estudo recente (**Christesen et al., 2007**) que avaliou sua utilidade no diagnóstico diferencial pré-cirúrgico da duas formas, concluiu os resultados genéticos devem ser analisados com cuidade e não devem ser considerados isoladamente.

Estudaremos o hiperinsulinismo congênito relacionado aos canais K^{ATP} por ser a etiologia mais freqüente e mais grave desta doença que, por não responder ao tratamento clínico, é submetida à pancreatectomia que disponibiliza tecido pancreático para estudo anátomo-patológico (histológico, imuno-histoquímico e genético-molecular). A relevância deste projeto apóia-se na ausência de evidências bibliográficas, de estudos genéticos do hiperinsulinismo congênito com crianças brasileiras, considerando-se a determinação genética desta patologia e as diferenças epidemiológicas regionais entre os países relatadas na literatura mundial.

3 OBJETIVOS

- 1) Caracterizar os casos de hiperinsulinismo congênito (CHI) no nosso meio, segundo idade, sexo, tratamentos clínico e cirúrgico, recorrência dos sintomas hipoglicêmicos e evolução a longo prazo (mínimo de 12 meses pós-pancreatectomia);
- 2) Avaliar a utilidade dos parâmetros histopatológicos clássicos descritos na literatura como substrato diagnóstico da CHI, através da comparação com casos controle pareados por idade;
- 3) Investigar possíveis vias patogenéticas das formas difusa e focal do CHI através de:
 - a) pesquisa de mutações genéticas nos genes que codificam as duas proteínas que formam os canais K^{ATP}: exons 33 a 37 do gene ABCC8, que codificam um dos dois sítios de ligação do ATP da proteína SUR 1, e único exon do gene KCNJ11 da proteína Kir 6.2
 - b) identificação da presença das proteínas constituintes dos canais K^{ATP} através do exame imuno-histoquímico com os anticorpos anti-SUR 1 anti-Kir 6.2
 - c) quantificação do índice de proliferação celular das células β nas formas difusa e focal do CHI, através da imunoexpressão simultânea (dupla marcação) de insulina e de Ki -67

4 MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Seleção dos casos e revisão histológica

Nos últimos 20 anos (1987-2007) foram diagnosticadas 12 crianças com hiperinsulinismo congênito, não responsivo ao tratamento clínico, na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr - HC - FMUSP) e submetidas a tratamento cirúrgico na Divisão de Cirurgia Pediátrica do ICr - HC - FMUSP. Para este estudo foram incluídos os casos com disponibilidade de blocos de parafina no arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DAP - HC - FMUSP), correspondentes às peças cirúrgicas provenientes de pancreatectomias parciais (85%) ou quase-totais (98%).

Do total de 12 pacientes, 01 foi excluído do estudo devido à falta dos blocos de parafina e das lâminas. Das 11 crianças estudadas, 01 foi a óbito, 06 retornaram para seus Estados de origem após aproximadamente um ano de seguimento ambulatorial no ICr, e 04 moram no Estado de São Paulo e continuam em acompanhamento clínico trimestral nas Unidades de Endocrinologia e de Gastroenterologia Pediátricas do ICr - HC - FMUSP.

No Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) foram realizados novos blocos de parafina e novos cortes histológicos de todos os casos, e as novas lâminas, coradas ao H&E e submetidas a exame imuno-histoquímico com insulina e Ki-67, receberam revisão histológica segundo os critérios diagnósticos mais recentes.

Os 04 pacientes que continuam em acompanhamento ambulatorial e suas mães cederam sangue periférico para estudo genético-molecular, que foi colhido no Laboratório Clínico do ICr-HC-FMUSP durante as consultas de acompanhamento ambulatorial (03 pacientes) e na Unidade de Cirurgia Pediátrica no período pós-operatório da internação (01 paciente), com autorização e livre consentimento preenchidos e assinados pelos responsáveis (as mães) com autorização da equipe médica.

Como controles foram utilizadas amostras de tecido pancreático emblocado em parafina obtido de necrópsias de 19 crianças na mesma faixa etária, com 01 dia a 12 meses de idade, normoglicêmicas e filhos de mães não-diabéticas, que foram à óbito por patologias não relacionadas ao pâncreas ou ao metabolismo da glicose. As necrópsias foram realizadas até 6 horas após o óbito, entre os anos de 2003 e 2007, no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário – USP. As causas de morte dos atestados de óbito constam na **TABELA 1**.

Tabela 1: Causas de óbito dos controles de necrópsias

Controles de Pâncreas	Sexo	Idade do Óbito	Diagnósticos
1	F	01 dia	RN de Termo / Síndrome de Aspiração Meconial / Pneumonite Química
2	M	01 dia	RN de Termo / Síndrome de Aspiração Meconial / Pneumonite Química
3	M	03 dias	RN de Termo / Síndrome de Patau (Trissomia 13) / Broncopneumonia
4	F	04 dias	RN de Termo / Cardiopatia Congênita (CIV) / Broncopneumonia
5	M	05 dias	RN de Termo / Síndrome de Aspiração Meconial / Choque Séptico
6	F	01 mês	RN de Termo / Enterocolite Aguda / Choque Séptico
7	F	01 mês	RN de Termo / Siderose/ Broncopneumonia
8	F	01 mês	RN de Termo / Cardiopatia Hipertrófica Primária
9	M	02 meses	RN de Termo / Meningoencefalite por Klebsiella Pneumoniae
10	M	03 meses	RN de Termo / Síndrome de Cimitarra (Conexão Venosa Pulmonar Anômala)
11	F	05 meses	RN de Termo / Doença de depósito / Dano Alveolar Difuso
12	M	05 meses	RN de Termo / Broncopneumonia
13	M	07 meses	RN de Termo / Displasia Bronco-Pulmonar / Dano Alveolar Difuso
14	M	07 meses	RN de Termo / Síndrome de Stevens-Johnson / Pneumonia por Adenovírus
15	F	08 meses	RN de Termo / Displasia Bronco-Pulmonar / Broncopneumonia
16	F	09 meses	RN de Termo / Varicela / Broncopneumonia
17	F	10 meses	RN de Termo / Síndrome de Pallister - Killian / Broncopneumonia
18	F	11 meses	RN de Termo / Síndrome de Waterhouse – Friderichsen (Púrpura Meningocóccica Fulminante)
19	M	12 meses	RN de Termo / Síndrome de Down / Broncopneumonia

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Dados clínicos

Os dados clínicos, cirúrgicos e epidemiológicos como idade, sexo, consanguinidade dos pais, forma de apresentação clínica, idade do diagnóstico, duração dos sintomas, dados de exames laboratoriais, período de tratamento clínico, idade da cirurgia, extensão da pancreatectomia, necessidade de ampliação cirúrgica e evolução clínica (recorrência, tempo livre de doença, desenvolvimento de diabetes ou de retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor ou evolução para óbito) foram obtidos através da consulta aos prontuários do SAME-ICr, das informações fornecidas pela equipe médica responsável pelas crianças, e da minha presença nas consultas de acompanhamento ambulatorial periódico dos pacientes, realizadas pela equipe dos médicos pediatras da Divisão de Endocrinologia do Instituto da Criança do HC-FMUSP.

Todos os dados foram obtidos segundo um protocolo pré-determinado (ANEXO C) preenchido para cada uma das 11 crianças.

4.2.2 Parâmetros histológicos e imuno-histoquímicos do CHI-K^{ATP}

Os blocos de parafina contendo o tecido pancreático previamente fixado em formalina a 10% e submetido a processamento histológico de rotina, foram re-emblocados e submetidos a novos cortes (3 μ m) corados

pela hematoxilina-eosina (H&E) e submetidos a exame imuno-histoquímico com o anticorpo insulina. As lâminas foram analisadas por 2 observadores (SML e MCNZ) segundo os parâmetros histopatológicos cito-arquiteturais do CHI da descrição histológica clássica de **Jaffe et al., 1980** e os recentes critérios de **Suchi et al., 2003; Suchi et al., 2004 e De Lonlay et al., 2007**.

Cada parâmetro histopatológico foi avaliado em todo o material de pâncreas disponível de cada paciente (todos os blocos) e classificado de acordo com sua presença em: leve (+), moderada (++) e intensa (+++), e cada caso foi inicialmente caracterizado como forma focal ou forma difusa.

4.2.2.1 Forma Focal

- 1) Presença de área(s) pequena(s) (média de 5,0 mm) de hiperplasia focal adenomatosa, ocupando mais do que 40% do lóbulo, que comprime o pâncreas acinar exócrino circundante ou o incorpora de forma irregular.
- 2) Aspecto normal das células β e das ilhotas de Langerhans no tecido pancreático remanescente com *nuclear crowding* das células β (os núcleos das células β parecem tocar-se, isto é, estão pouco separados entre si pois o citoplasma não é amplo) que representa ausência de hipofunção endócrina.

Obs.: Estes parâmetros são necessários para o diagnóstico da forma focal do CHI.

Mais raramente foram descritas as formas bifocal, multifocal e também focos extra-pancreáticos (**Giurgea et al., 2006; Peranteau et al., 2007**). A forma focal não é composta somente de células β e a detecção de glucagon e somatostatina por imunohistoquímica revela a presença das células α e γ nos focos hiperplásicos (**Sempoux et al., 2003**).

4.2.2.2 Forma Difusa

- A) Critérios Histológicos Funcionais (indicativos de hiperfunção endócrina):
- 1) Nucleomegalia das células β associada à presença de núcleos bizarros, ovóides ou gigantes
 - 2) Volume aumentado do citoplasma

Obs.: A nucleomegalia é definida como a presença de células β com núcleos > 3 vezes o tamanho do núcleo das células endócrinas adjacentes.

- B) Critérios Histológicos de Maturação:
- 1) Aglomerados de ilhotas de Langerhans dispersos por todo o pâncreas, células β isoladas ou formando pequenos blocos em localização centro-acinar.
 - 2) Tamanho e forma das ilhotas (ilhotas de tamanhos variados e contornos irregulares), distribuição das ilhotas, presença de ilhotas em meio aos septos fibrosos pancreáticos sem associação com o tecido exócrino mas frequentemente próximas a um ducto, por vezes ilhotas “gigantes” em meio a um septo fibroso frequentemente localizado no limite do lóbulo.

- 3) Presença de complexos díctulo-insulares definidos como pequenos ductos conectados a aglomerados de células endócrinas ou células isoladas que parecem “brotar” do epitélio ductal.

Obs.: Estes parâmetros não são necessários para o diagnóstico da forma difusa, considerando-se a possibilidade do pâncreas ser histologicamente normal nesta forma do CHI.

4.2.3 Estudo imuno-histoquímico (IHQ) com os anticorpos insulina e Ki-67 separadamente

Para complementar o estudo histológico, e principalmente para a visualização das células β isoladas na região centro-acinar e dos complexos díctulo-insulares, cuja identificação não é possível ao H&E, foi realizado exame imuno-histoquímico com os anticorpos insulina e Ki-67 separadamente. A descrição detalhada dos métodos e do procedimento IHQ encontra-se no **ANEXOS D e E**.

4.2.4 Estudo imuno-histoquímico (IHQ) de dupla marcação : insulina e Ki-67 simultaneamente

Para a avaliação do índice de proliferação das células β foi utilizada a técnica imuno-histoquímica de dupla marcação com anticorpo anti-insulina positivo de padrão granular no citoplasma das células β e o anticorpo anti-

Ki-67 positivo nos núcleos em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2, M), utilizando o *kit Dako EnVision G/2 Doublestain System, Rabbit / Mouse* (DAB+ / Permanent Red) Code K5361. As especificações dos anticorpos utilizados, assim como dos sistemas de detecção e amplificação estão disponíveis no **ANEXO D**. As reações foram realizadas segundo indicações do *kit* comercial com algumas modificações (**ANEXOS D e E**).

4.2.4.1 Quantificação da expressão de Ki-67 nas células β

O índice de proliferação celular das células β (Ki-67-LI) definido como o número de núcleos de células β positivos para o marcador Ki-67 por 1000 células β foi aferido em campos de grande aumento (400X) no tecido pancreático das 11 crianças com CHI e dos 19 controles. Foram contadas no mínimo 1000 células β de cada caso e de cada controle, o número de núcleos Ki-67 positivos em cada célula.

Para estas análises morfométricas de imagem utilizamos o software Image-Pro Plus 4.1 for Windows (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, USA), instalado em um microcomputador modelo IBM ligado a uma câmera digital (JVC TK-C1380 Color Video Camera, Victor Company of Japan Limited, Japan) acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Germany).

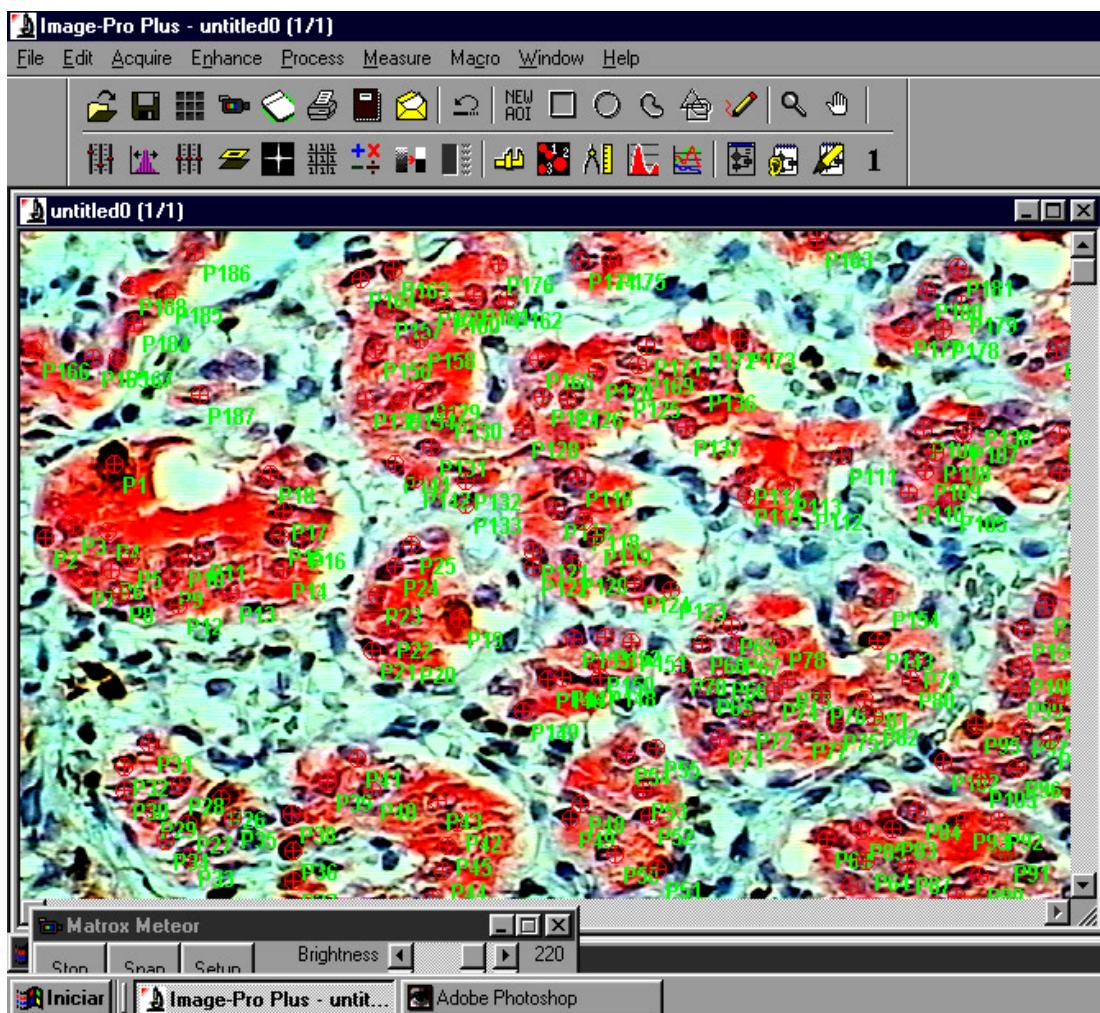


Figura 6: Análise digital morfométrica de imagem – método quantitativo do índice de proliferação das células β (Ki-67-LI) – IHQ de dupla marcação insulina / Ki-67 – 400X

4.2.5 Estudo imuno-histoquímico das proteínas SUR 1 e Kir 6.2 dos canais K^{ATP} das células β

Para avaliar se proteínas SUR1 e Kir6.2 dos canais K⁺ / ATP foram produzidas e se estão presentes ou ausentes foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-Kir 6.2 e anti-SUR 1, segundo especificações do **ANEXOS D e E**.

4.2.6 Estudo genético-molecular para pesquisa de mutações nos genes ABCC8 (SUR 1) e KCNJ11 (Kir 6.2)

4.2.6.1 Extração de DNA do sangue periférico

Para a extração do DNA do sangue periférico, DNA genômico foi obtido a partir de 15 ml de sangue periférico de 4 pacientes (3 com a forma difusa e 1 com a forma focal), colhidos com 25 mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA). Quando o DNA genômico de sangue periférico das mães desses 4 pacientes, foi disponibilizado, também foi analisado. A técnica utilizada foi a de extração com sal (salting-out) descrita no

ANEXO F.

4.2.6.2 Extração de DNA do tecido pancreático incluído em parafina

Para a extração do DNA do tecido em parafina, DNA genômico foi obtido a partir do tecido incluído em parafina de 6 pacientes cujo sangue periférico não foi disponibilizado, segundo procedimento detalhado descrito no **ANEXO G.**

4.2.6.3 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi realizada para amplificação do único exon do gene *KCNJ11* da subunidade protéica Kir 6.2 dos canais K^{ATP} (ENSG00000187486), subdividido em 4 fragmentos, em DNA genômico de sangue periférico de 4 pacientes e dos exons 33 a 37 do gene *ABCC8* da subunidade protéica SUR 1 dos canais K^{ATP} (ENST00000302539) em DNA genômico de sangue periférico (4 pacientes) e de tecido incluído em parafina (6 pacientes), segundo o procedimento descrito no **ANEXO H**.

A seqüência dos *primers* utilizados, temperatura de *annealing* e tamanho dos fragmentos amplificados para estes exons estão descritos nas **TABELAS 2 e 3**. A localização dos *primers* na seqüência genômica para os genes acima pode ser visualizada nos **ANEXOS I e J**.

Tabela 2: Características dos *primers* utilizados para a amplificação do exon único do gene KCNJ11 (Kir 6.2)

Primer	Seqüência	Temperatura de annealing (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Fragmento 1	GACTCTGCAGTGAGGCCCT	53	430
	GCCACACACATTGCTCATCT		
Fragmento 2	GCCACACACATTGCTCATCT	50	410
	CTTCATGCTACGTGTGGGTG		
Fragmento 3	GACCCTCATCTTCAGCAAGC	50	470
	TTGTGCCCATTGTAGCTGAG		
Fragmento 4	ATCATCGTCATCCTGGAAAGG	50	460
	ATCCAGGGTGTACAAGGCA		

Tabela 3: Características dos *primers* utilizados para a amplificação dos exons 33 a 37 do gene ABCC8 (SUR 1)

Primer	Seqüência	Temperatura de annealing (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
33s	GAG GAC AGA ACT AAG CGA ACC	53	195
33 ^a	A CCC TCT CCC TGA GCC TCT C		
34s	CCC ATG CCT GGT GGC TGA G	53	207
34 ^a	ACG CCT GTC CTG CAG CAT TG		
35s	GCA TAG AGC TAT TCC CAG CAG	52	166
35 ^a	C TGG GGT GCC CGC CTT ACA AC		
36s	TCA CCG CCT TCC CCT GCA C	52	211
36 ^a	TCC AGA TCT GAT GGA ACT GAG		
37s	GAC CCT GCT CCC TCC CTA C	52	197
37 ^a	AGG GTC CTT GAG TGC CCA AC		

4.2.6.4 Sequenciamento automático

Os produtos amplificados foram submetidos à purificação enzimática utilizando-se 2 µl de ExoSap-IT (exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão, *Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, Ohio, USA*) para cada 5 µl do produto de PCR, por 15 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos a 80°C.

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9600 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) utilizando-se o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) de acordo com as recomendações do fabricante.

O produto da reação de sequenciamento foi purificado em colunas Centri Sep (*Princeton Separation, Adelphia, New Jersey, USA*) e submetido à eletroforese capilar e analisado em seqüenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer Automatic DNA Sequencer (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

4.3 Análise estatística

Para a comparação entre os valores do Ki-67-LI (Ki-67 *Labelling Index*) dos pacientes e dos controles, foi utilizado o modelo estatístico generalizado linear onde o Ki-67-LI foi considerado a variável dependente e a idade ($\leq 3m$ vs $> 3m$) e a condição de doença (CHI vs controles) foram consideradas as variáveis preditivas. A análise foi realizada utilizando-se o software SPSS v.13.0®. Somente valores de P menores de 0,05 foram considerados como indicadores de significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

Os dados obtidos nos prontuários dos pacientes encontram-se resumidos na **TABELA 4**, e indicam que o diagnóstico de CHI, em todos os pacientes, foi estabelecido segundo os seguintes critérios clínico-laboratoriais: quadro clínico com sintomas de hipoglicemia (convulsões), necessidade de altas doses de glicose EV para manter os níveis de euglicemia e insulina sérica $> 5 \mu\text{U} / \text{ml}$ sob condição de hipoglicemia (glicemia $\leq 50 \text{ mg/dl}$).

Do total de 11 crianças 7 (63,6%) são do sexo feminino e 4 (36,3%) do sexo masculino. Quase a metade (45,4%) das crianças são filhos de pais consangüíneos (3 filhos de primos de 1º grau e 2 filhos de primos de 2º grau). Duas crianças são gêmeas. Três nasceram prematuros e dos 8 restantes que nasceram de termo 3 são macrossômicos com peso > 4000 gramas, um deles pesando 5390 gramas. Todas as crianças apresentaram convulsão como primeiro sintoma, a maioria (54,5%) ao nascimento e o restante no período de 25 dias a 5 meses de idade. Oito crianças (72,7%) foram tratadas com diazóxido por períodos que variaram de 20 dias a 10 meses, três pacientes não receberam diazóxido e conseguiram ser mantidos até a cirurgia apenas com glicose, e o paciente com a forma focal do CHI, recebeu diazóxido, octreotide e glicose até a cirurgia.

Nenhuma das crianças respondeu adequadamente ao tratamento clínico com diazóxido, e portanto todas foram submetidas à pancreatectomias com extensão variável de 85% a 98%, com idades que variaram de 26 dias a 13 meses. A maioria dos pacientes (72,7%) foi submetida a duas cirurgias, inicialmente a pancreatectomia de 85% ou 90% e, como mantinham os níveis de hipoglicemia foram re-operados com retirada quase-total de 95% e 98% do pâncreas. Duas crianças cuja primeira cirurgia retirou respectivamente 90% e 95% do pâncreas não foram re-operadas pois a primeira permaneceu normoglicêmica no pós-operatório tardio e a segunda foi a óbito no 5º PO com 31 dias de vida. Dentre todos os pacientes esta última foi aquela submetida mais precocemente à cirurgia, com 26 dias de vida, e foi a única a evoluir para óbito.

Do total de 11 pacientes 7 (63,6%) evoluíram com diabetes mellitus tardio (após 12 meses da cirurgia) dos quais 2 desenvolveram diabetes no início da puberdade com 11 anos de idade.

Quanto ao atraso do desenvolvimento neuro-psico-motor, 5 (45,4%) crianças são normais, 1 foi a óbito, e 5 (45,4%) apresentam retardo do DNPM com seqüelas importantes das quais 2 foram operadas tardeamente com 12 e 13 meses de idade.

Tabela 4: Dados clínicos

Pacientes/ Sexo	1 / F	2 / F	3 / M	4 / F	5 / F #	6 / F	7 / M	8 / F #	9 / M	10 / F	11 / M
País consanguíneos	Não	Primos 1º	Não	Não	Primos 1º	Primos 2º	Primos 2º	Primos 1º	Não	Não	Não
Data de nascimento	23/11/2002	07/09/1988	04/11/1996	30/11/1989	28/03/1992	10/05/1987	15/01/1992	28/03/1992	01/10/1997	22/01/1988	09/06/2006
Peso ao nascer	2600 g prematuro	5390 g termo	4350 g termo	2790 g termo	1650 g prematuro	3200 g termo	3440 g termo	1590 g prematuro	3350 g termo	3340 g termo	4240 g termo
Idade 1º s sintomas	nascimento	nascimento	nascimento	nascimento	3 meses	25 dias	4 meses	3 meses	nascimento	5 meses	nascimento
Idade diagnóstico CHI	2 dias	38 dias	4 meses	4 meses	3 meses	50 dias	6 meses	3 meses	2 meses	12 meses	5 meses
Glicose sérica *	10 mg/dl	18 mg/dl	19 mg/dl	35 mg/dl	14 mg/dl	50 mg/dl	14 mg/dl	13 mg/dl	30 mg/dl	17 mg/dl	37 mg/dl
Insulina sérica **	7,4 µU/ml	22 µU/ml	44 µU/ml	104 µU/ml	112 µU/ml	137 µU/ml	30 µU/ml	34 µU/ml	44 µU/ml	30 µU/ml	89 µU/ml
Teste do *** glucagon	Inconclusivo	Normal	Não realizado	Não realizado	Normal	Inconclusivo	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Tratamento c/ diazóxido	Sim 26 dias	Não	Sim	Não	Sim 20 dias	Não	Sim 23 dias	Sim 80 dias	Sim 10 m	Sim 30 dias	Sim
Idade cirurgia	26 dias	50 dias	4m 6d	4 m 23 d	6 m	6m 20d	7m 10d	8m 12d	12 m	13 m 5d	10 m 14d
Pancreatectomia	95%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	85%
Complementação da cirurgia	Não	98%	95%	Não	95%	95%	95%	95%	98%	2ª 95% 3ª 98%	98%
Pós-operatório	Óbito 5º PO	Alta no 40º PO	Alta no 50º PO	Alta no 5º PO	Alta no 55º PO	Alta no 28º PO	Alta no 11º PO	Alta no 55º PO	Alta no 26º PO	Alta no 40º PO	Alta no 49º PO
Evolução	Óbito c/ 31 dias	atraso DNPM	D e atraso DNPM	Normal	D c/ 11 anos	atraso DNPM e D	Normal	D c/ 11 anos	D e atraso DNPM	D e atraso DNPM	D

D- Diabetes; DNPM – Desenvolvimento Neuro-Psico-Motor. Todos tem a forma difusa do CHI exceto o 11 com a forma focal. Somente os pacientes 5, 8, 9 e 11 tem amostras de sangue periférico para a análise genético-molecular. * Hipoglicemia = glicemia < 40 mg / dl ; ** Hiperinsulinemia = Insulina sérica > 5µ U / ml com glicemia < 50 mg / dl ; *** Teste positivo = aumento da glicemia > 30 mg / dl após 0,03 mg / kg de glucagon EV. # As pacientes 5 e 8 são gêmeas.

5.2 Aspectos histopatológicos

Nos cortes histológicos corados ao H&E, nem sempre foi possível distinguir células β isoladas, complexos díctulo-insulares ou mesmo ilhotas constituídas por pequenos agrupamentos de células endócrinas em meio às células acinares do pâncreas exócrino. Por esse motivo, o estudo da arquitetura endócrina das células β no tecido pancreático dos pacientes e dos controles, foi obtido pela avaliação conjunta do H&E e da IHQ para insulina.

Os resultados da análise dos critérios histológicos funcionais e de maturação estão descritos na **TABELA 5** (pacientes com CHI difuso), **TABELA 6** (controles ≤ 3 meses de idade) e **TABELA 7** (controles > 3 meses de idade), e ilustrados nas **Figuras 7 e 12** (critérios funcionais) e **Figura 8** (critérios de maturação).

Na forma difusa do CHI, merece ser destacado o fato de que em 2 pacientes, com idades de 26 dias e 4 meses, o tecido pancreático não apresentou nenhum dos parâmetros histológicos funcionais ou de maturação, e curiosamente o pâncreas destes dois pacientes mostrou áreas de *agregados frouxos de ilhotas* (*loose clusters of islets*) que também foram observadas em um dos pâncreas controle (**Figuras 21-23**). Nos outros pacientes os seguintes parâmetros histológicos estão presentes em mais de 50% dos casos: presença de complexos díctulo-insulares (63,6%) (**Figuras 24 – 27 e 29**) e nucleomegalia (54,5%) (**Figuras 7 e 12**). Os demais critérios histológicos aparecem em menos

da metade dos pacientes, com variação ampla quanto à presença destas alterações (9,0% a 36,3%).

No nosso estudo, os critérios funcionais (nucleomegalia e citoplasma amplo) não foram observados em nenhum dos pâncreas das crianças controle, estando presentes em 54,5 % e 27,2 % dos casos respectivamente.

As evidências histológicas consideradas como critérios de maturação, especialmente *ilhotas septais* (**Figuras 9 – 11**) e *células β isoladas e espalhadas* (**Figuras 9 e 28**), estavam presentes principalmente nos recém-nascidos controle ≤ 3 meses de idade. Ao contrário, nos pacientes com CHI, apesar de pouco frequentes, estes critérios foram mais intensos nos recém-nascidos > 3 meses de idade.

Na criança com a forma focal do CHI, foram observadas três áreas adenomatosas localizadas na cabeça do pâncreas (**Figuras 13 – 16 e 19**). No pâncreas de duas crianças com a forma difusa do CHI, que não apresentavam nucleomegalia, e em um pâncreas controle foram evidenciadas áreas de “agregados frouxos de ilhotas”, histologicamente muito semelhantes às áreas adenomatosas do paciente com a forma focal do CHI, porém com arranjo mais frioso (**Figuras 21 – 23**).

Tabela 5: Alterações histológicas dos pacientes com CHI difuso

Faixa etária	≤ 3 meses										> 3 meses		
	* 1	2	* 3	4	5	6	7	8	9	10	% dos pacientes com o critério histológico		
Pacientes													
Idade da cirurgia	26d	50d	4m 6d	4m 23d	6m	6m 20d	7m 10d	8m 12d	12m	13 m 5d			
Critérios Histológicos	Análise semi-quantitativa: + (leve), ++ (moderada), +++ (acentuada)												
Critérios Histológicos de Maturação													
Complexos dúc-tulointersticiais (células β ‘bro-tando’ do epitélio ductal)	–	–	–	+	++	+++	+++	++	+	++	+	63,6 %	
Ilhotas em septo fibroso lobular	–	+	–	+	–	++	+	–	–	–	–	36,3 %	
Células β em pequenos blocos intra-acinares	–	–	–	–	+	++	–	+	–	–	–	27,2 %	
Células β isoladas formando ‘chuveiro’ (<i>spreading</i>)	–	++	–	–	–	++	–	+++	–	–	–	27,2 %	
Critérios Histológicos Funcionais													
Nucleomegalia	–	+	–	+	++	+++	++	–	–	+	54,5 %		
Células β com citoplasma aumentado	–	+	–	+	–	++	–	–	–	–	–	27,2 %	

* Ausência destes critérios histológicos no pâncreas 1 e 3 (todo o material cirúrgico destes pacientes foi submetido a exame histológico), entretanto nestes pacientes foram identificados *aglomerados frouxos de ilhotas* (*loose clusters of islets*).

Tabela 6: Histologia dos controles \leq 3 meses de idade

Tabela 7: Histologia dos controles > 3 meses de idade

Controles	11	12	13	14	15	16	17 *	18	19	% dos controles com o critério histológico
Idade do óbito	5 m	5 m	7 m	7 m	8 m	9 m	10 m	11 m	12 m	
Critérios Histológicos	Análise semi-quantitativa: + (leve), ++ (moderada), +++ (acentuada)									
Critérios Histológicos de Maturação										
Complexos dúctulo-insulares (células β ‘brotando’ do epitélio ductal)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	66,6 %
Ilhotas em septo fibroso lobular	-	-	-	-	+	-	-	-	-	11,1 %
Células β em pequenos blocos intra-acinares	+	+	+	-	+	+	+	+	+	88,8 %
Células β isoladas formando ‘chuveiro’ (spreading)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	11,1 %
Critérios Histológicos Funcionais										
Nucleomegalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 %
Células β com citoplasma aumentado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 %

* No controle 17 foi identificada área de *aglomerado frouxo de ilhotas* (*loose clusters of islets*).

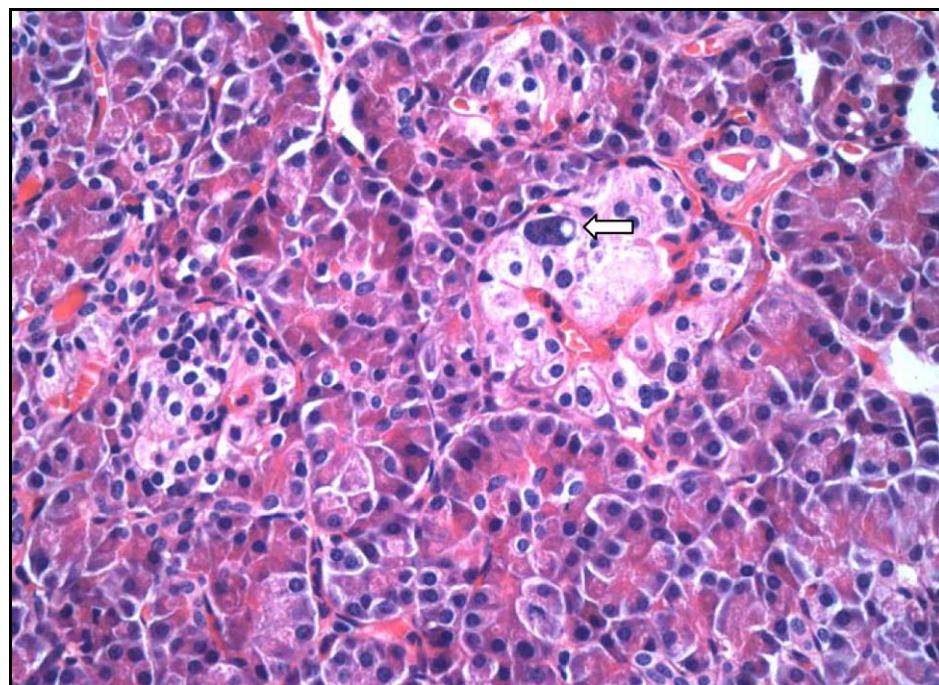


Figura 7: CHI-Difuso (6m) – critérios histológicos funcionais : aumento do citoplasma e nucleomegalia das células β (H&E – 200X)

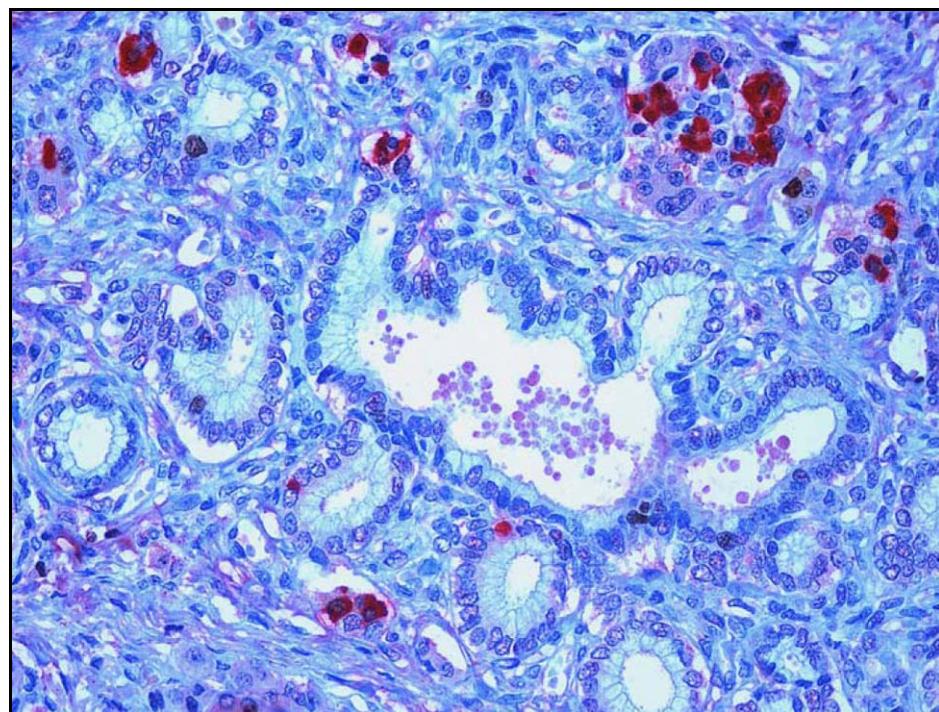


Figura 8: Controle (3 d) – critérios histológicos de maturação : complexos dúctulo-insulares, células β isoladas e em blocos (IHQ - insulina/Permanent Red e Ki-67/DAB – 400X)

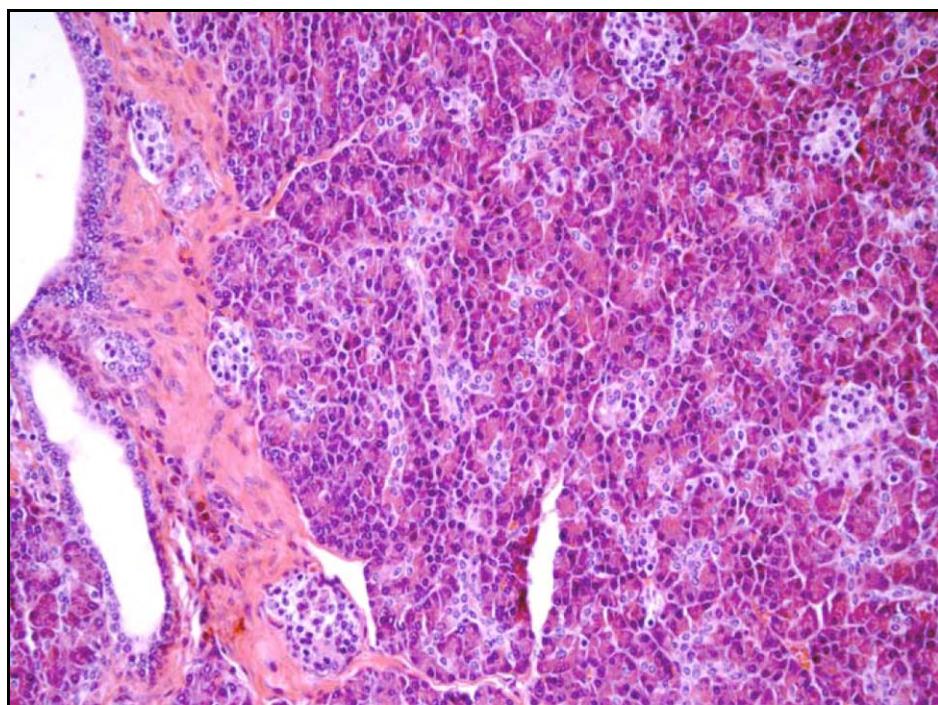


Figura 9: CHI-Difuso (6 m) – variação de tamanho das ilhotas, células β isoladas e espalhadas, ilhotas em septo inter-lobular (H&E – 100X)

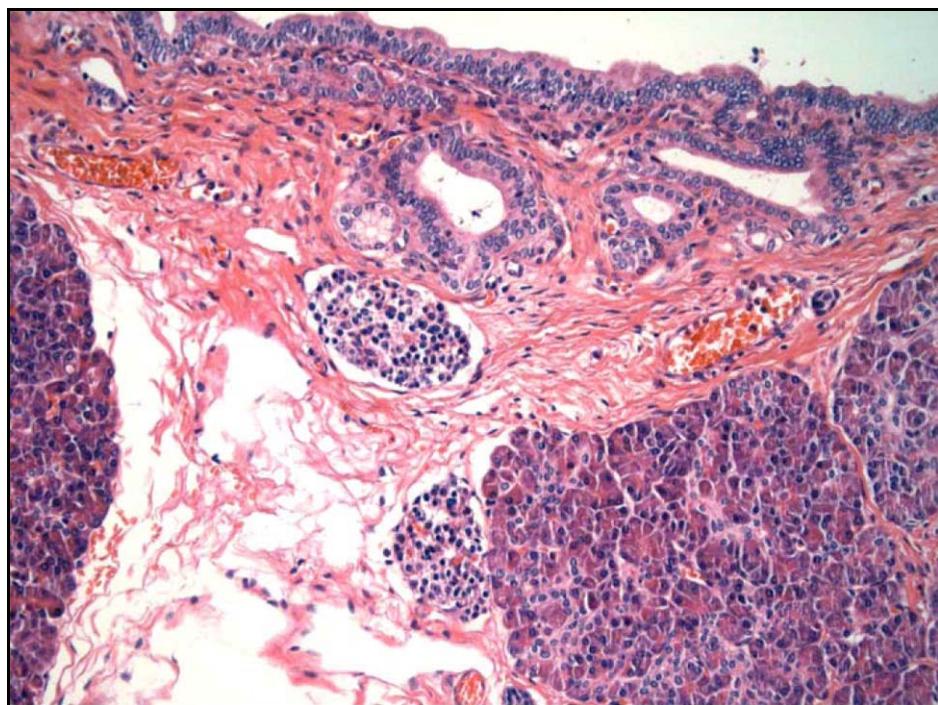


Figura 10: CHI-Difuso (6 m) – ilhotas em septo inter-lobular (H&E – 100X)

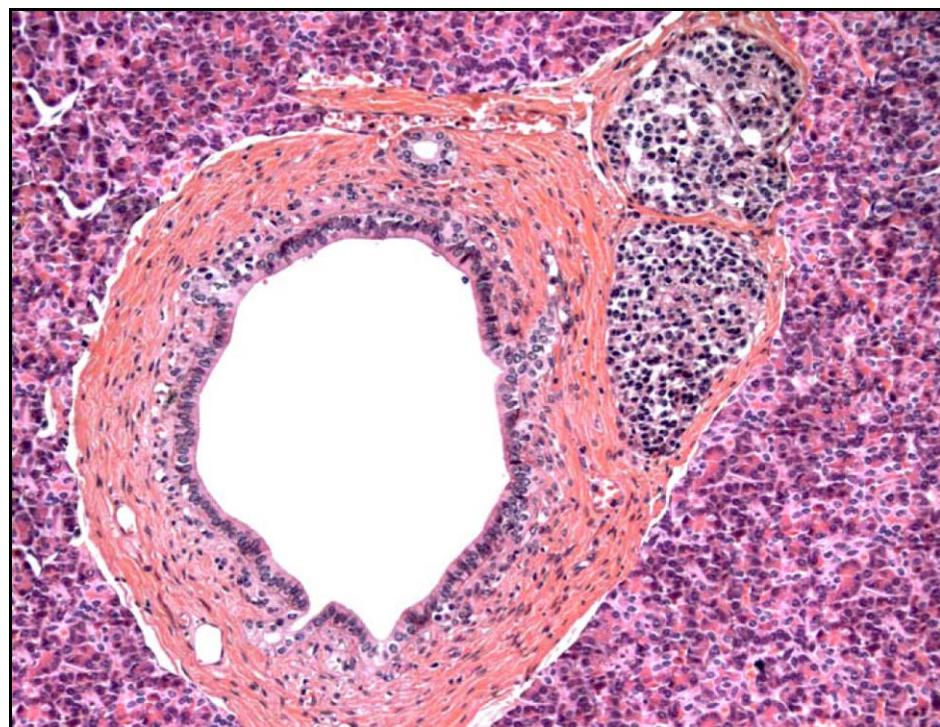


Figura 11: CHI-Difuso (6 m) – ilhotas em septo inter-lobular (H&E – 100X)

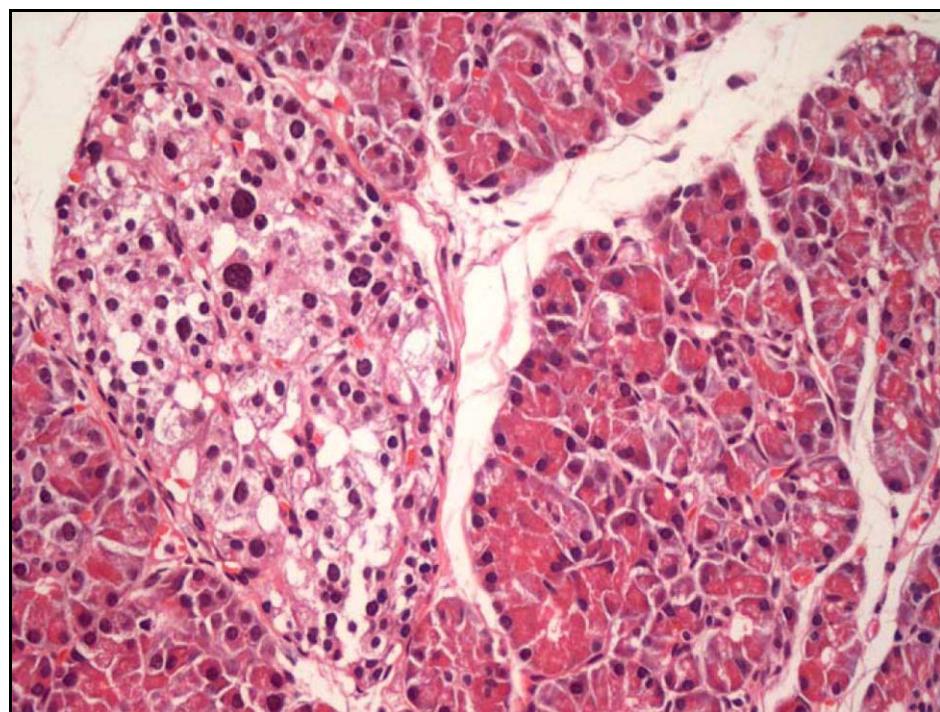


Figura 12: CHI-Difuso (6m) – nucleomegalia e citoplasma amplo das células β em uma ilhota gigante (H&E – 200X)

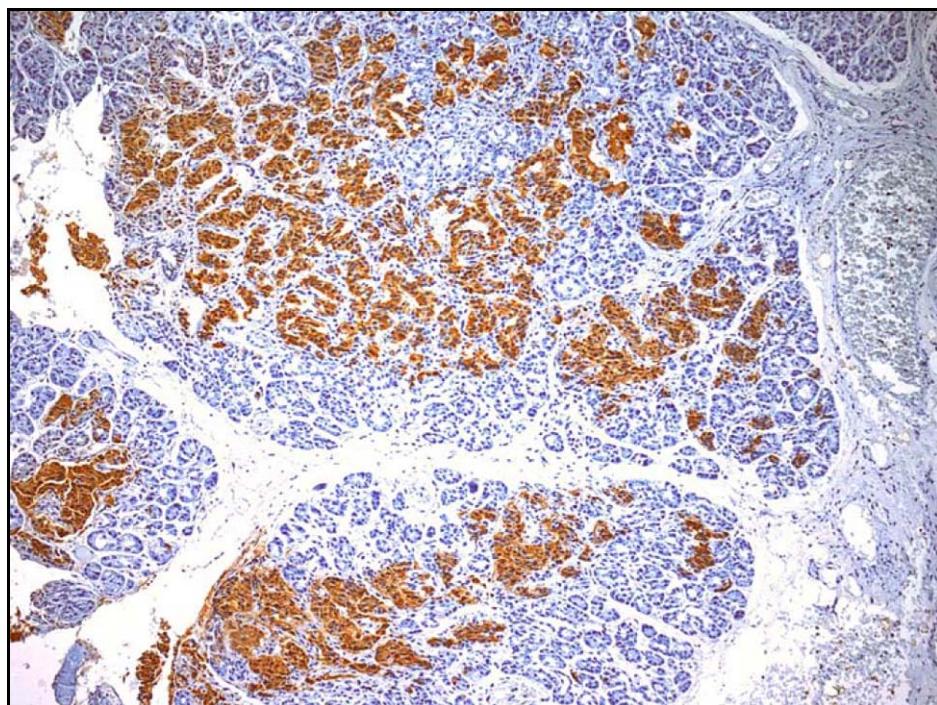


Figura 13: CHI-Focal (10 m) – área focal adenomatosa (IHQ – insulina – 40X)

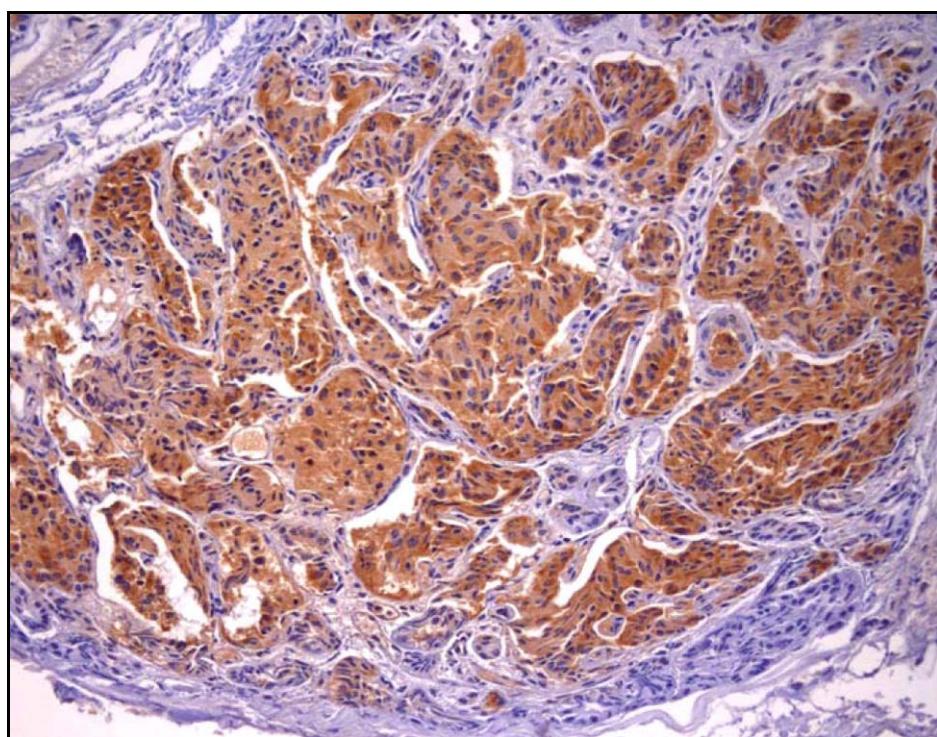


Figura 14: CHI-Focal (10 m) – área focal adenomatosa (IHQ – insulina – 200X)

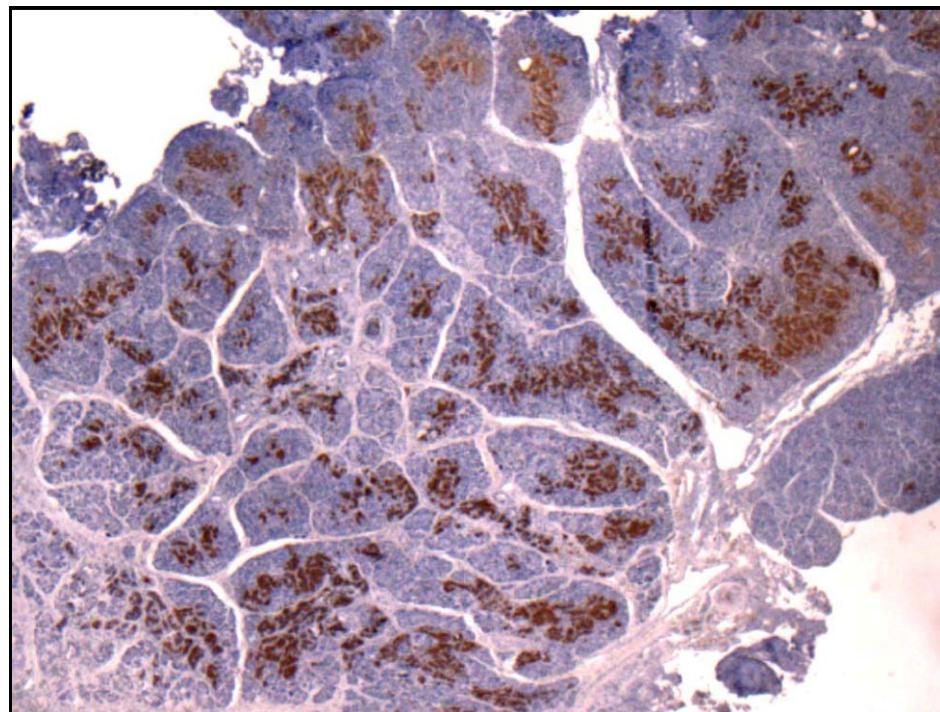


Figura 15: CHI-Focal (10 m) – área focal adenomatosa (IHQ – insulina – 12,5X - lupa)

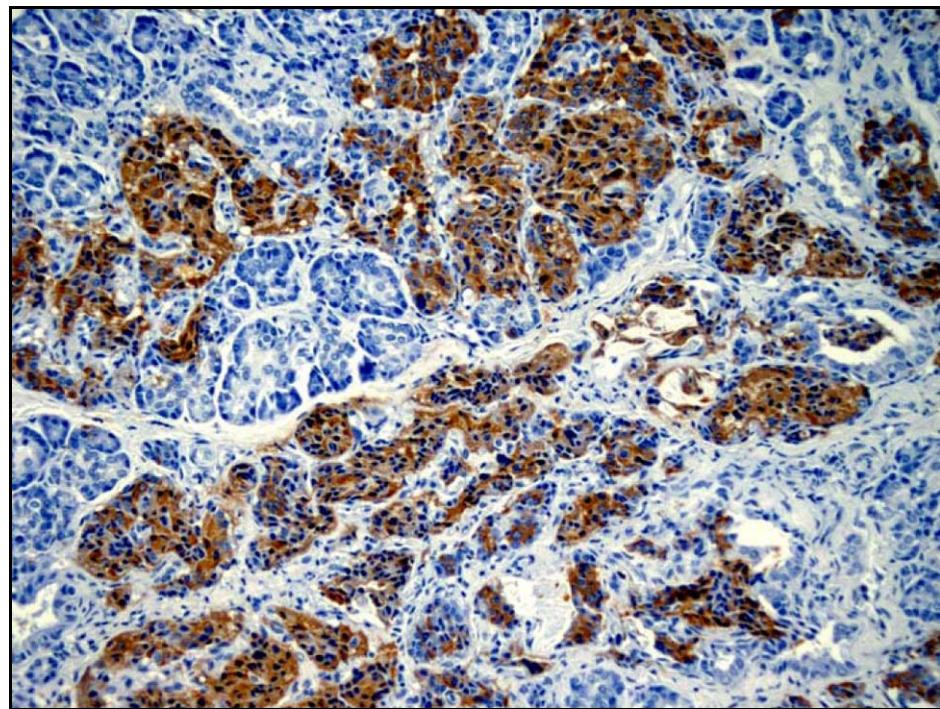


Figura 16: CHI-Focal (10 m) – área focal adenomatosa (IHQ – insulina – 200X)

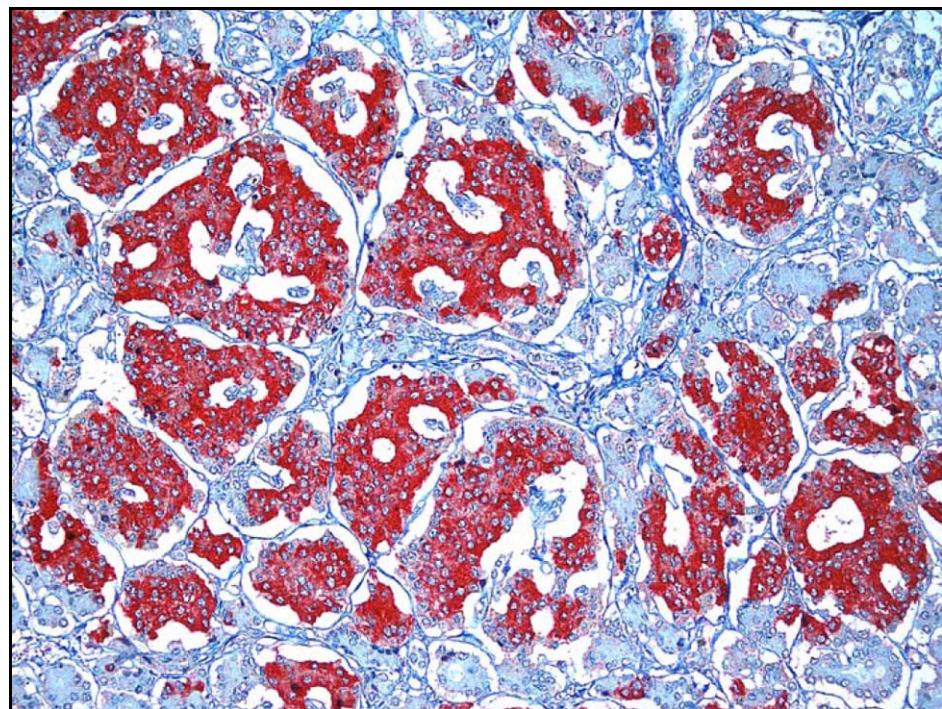


Figura 21: Controle (10 m) – agregados frouxos de ilhotas (IHQ – insulina/Permanent Red e Ki-67/DAB – 200X)

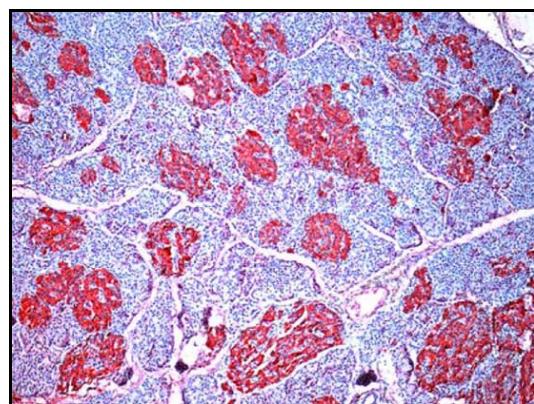


Figura 22: CHI-Difuso (4 m)

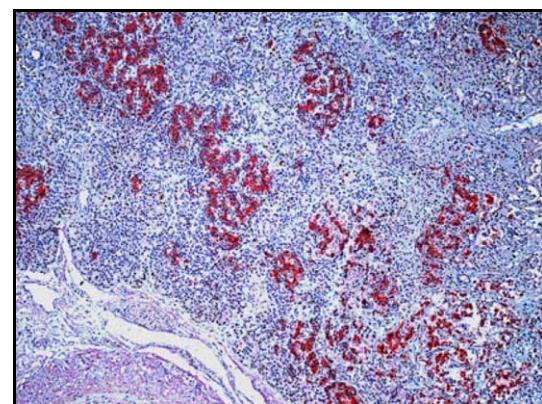


Figura 23: CHI-Difuso (26 d)

agregados frouxos de ilhotas (IHQ – insulina/Permanent Red e Ki-67/DAB – 40X)

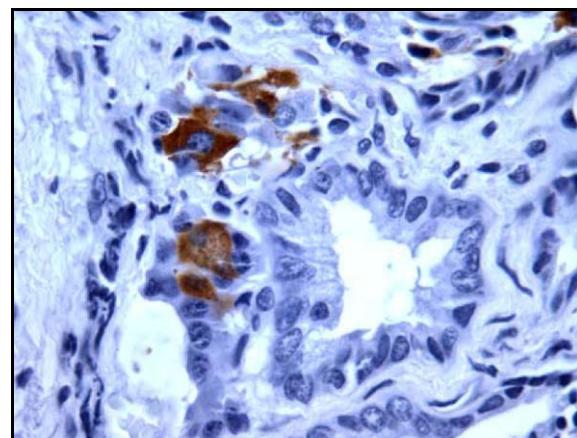


Figura 24

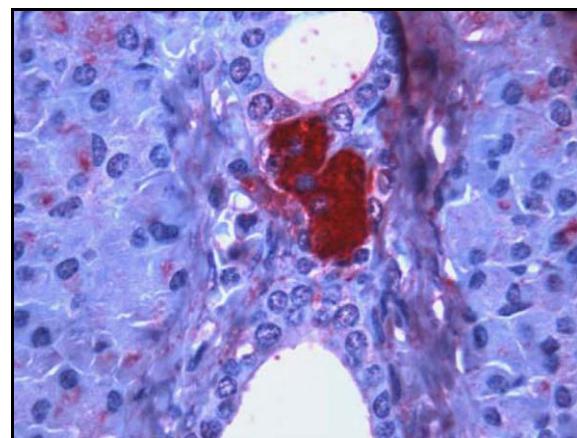


Figura 25

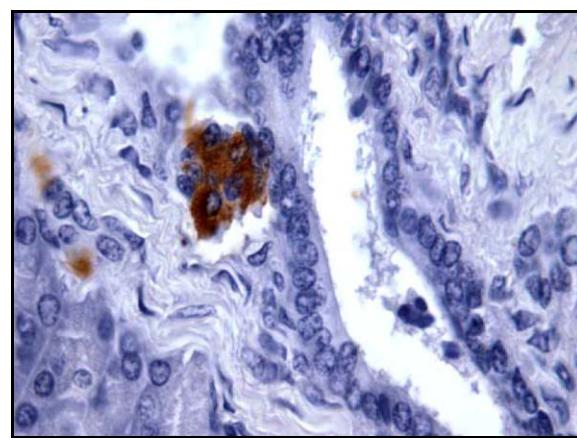


Figura 26

Figura 24: CHI-Focal (10 m) – complexo díctulo-insular em área de pâncreas normal (IHQ – insulina – 400X)

Figura 25: CHI-Difuso (6 m) – complexo díctulo-insular (IHQ – insulina/Permanent Red e Ki-67/DAB – 400X)

Figura 26: CHI-Difuso (7 m) – complexo díctulo-insular (IHQ – insulina – 400X)

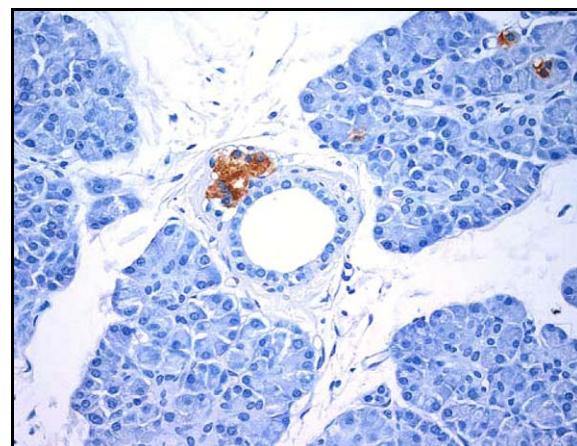


Figura 27

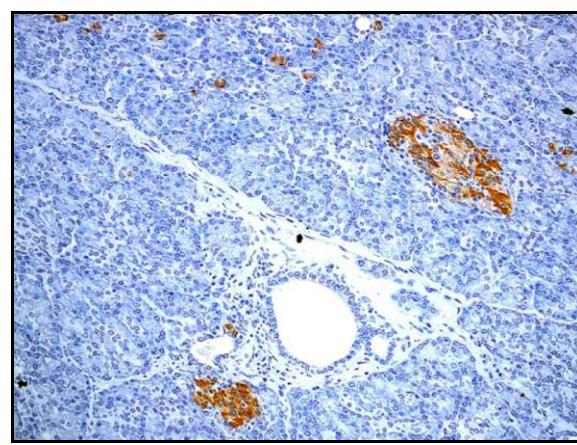


Figura 28

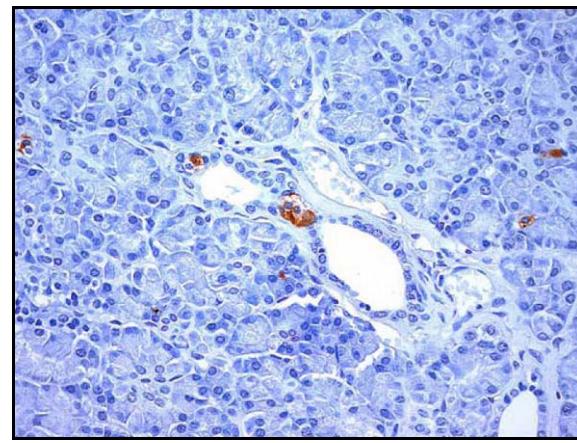


Figura 29

Figura 27: CHI-Difuso (6m) – complexo dúctulo-insular e células β isoladas (IHQ – insulina – 200X)

Figura 28: CHI-Difuso (6 m) – ilhotas de tamanho variável e células β isoladas (IHQ – insulina – 100X)

Figura 29: CHI-Difuso (6m) – complexo dúctulo-insular e células β isoladas (IHQ – insulina – 200X)

5.3 Aspectos imuno-histoquímicos

5.3.1 Avaliação da proliferação das células β

A análise quantitativa do índice de proliferação celular das células β (% Ki-67-LI), dos pacientes com CHI difuso e focal, e nos casos controle de crianças ≤ 3 meses e > 3 meses, são apresentados respectivamente nas **TABELAS 8 e 9** e na **Figura 18** (CHI Difuso), **Figura 20** (CHI Focal) e **Figura 17** (controle).

Nas crianças com CHI difuso, o índice de proliferação das células β foi maior do que no grupo controle ($P = 0,009$). Nos pacientes e controles, não foi observada correlação, estatisticamente significativa, entre o índice proliferativo e a idade nos pacientes ou nos controles ($P = 0,796$).

A **TABELA 10** mostra os valores das médias e desvio padrão nos grupos controle e com CHI nas diferentes faixas etárias.

Na **TABELA 8** podemos observar que as áreas adenomatosas da forma focal do CHI apresentaram um %Ki-67-LI muito elevado (10,15 %) quando comparado aos controles. As áreas não adenomatosas do pâncreas da criança com a forma focal mostraram um índice proliferativo de células β semelhante ao grupo controle. Por outro lado, as áreas de “agregados frouxos de ilhotas” observadas em duas crianças com a forma difusa do CHI pacientes 1 (**Figura 23**), paciente 4 (**Figura 22**) controle 17 (**Figura 21**) apresentaram baixo %Ki-67-LI (2,31 % no caso 1, 2,43 % no caso 4 e 1,54% no controle 17).

Tabela 8: Índice proliferativo das células β dos pacientes (Ki-67-LI) IHQ de dupla marcação com insulina e Ki-67

Pacientes	Idade da cirurgia	Total de células Insulina + (células β)	Total de núcleos Ki-67 + (células em divisão celular)	Índice de Proliferação celular (núcleos Ki-67 + por 1000 células β)	Índice de Proliferação Celular %Ki-67-LI
Pacientes \leq 3 meses de idade					
1	26d	1081	25	23,12 por mil	2,31 %
2	1m 20d	1075	22	20,46 por mil	2,04 %
Pacientes $>$ 3 meses de idade					
3	4m 6d	1046 1 ^a cirurg.	24	22,94 por mil	2,29 %
		1013 2 ^a cirurg.	25	24,67 por mil	2,46 %
4	4m 23d	1028	25	24,31 por mil	2,43 %
5	6m	1004	21	20,91 por mil	2,09 %
6	6m 20d	1029 1 ^a cirurg.	14	13,60 por mil	1,36 %
		1002 2 ^a cirurg.	27	26,94 por mil	2,69 %
7	7m 10d	1042	23	22,07 por mil	2,20 %
8	8m 12d	1022	28	27,39 por mil	2,73 %
9	12m	1021 1 ^a cirurg.	29	28,40 por mil	2,84 %
		1007 2 ^a cirurg.	36	35,74 por mil	3,57 %
10	13m 5d	1003 1 ^a cirurg.	22	21,93 por mil	2,19 %
		1014 2 ^a cirurg.	30	29,58 por mil	2,95 %
		1005 3 ^a cirurg.	33	32,83 por mil	3,28 %
11 CHI Focal	10m14d	1001 1 ^a cirurg.	16	15,98 por mil	1,59 % área normal
		1044 2 ^a cirurg.	106	101,53 por mil	10,15 % área adenomatosa

Tabela 9: Índice proliferativo das células β dos controles (Ki-67-LI) IHQ de dupla marcação com insulina e Ki-67

Controles de necrópsias	Idade do óbito	Total de células insulina + (células β)	Total de núcleos Ki-67 + (células em divisão celular)	Índice de proliferação Celular (núcleos Ki-67 + em 1000 células β)	Índice de proliferação celular % Ki-67-LI
Recém-nascidos \leq 3 meses de idade					
1	01 d	1090	12	11,00 por mil	1,10 %
2	01 d	1005	21	20,89 por mil	2,08 %
3	03 d	1041	22	21,13 por mil	2,11 %
4	04 d	1033	26	25,16 por mil	2,51 %
5	05 d	1057	18	17,02 por mil	1,70 %
6	01 m	1003	16	15,95 por mil	1,59 %
7	01 m	1021	21	20,56 por mil	2,05 %
8	01 m	1011	17	16,81 por mil	1,68 %
9	02 m	1074	20	18,62 por mil	1,86 %
10	03 m	1038	19	18,30 por mil	1,83 %
Recém-nascidos $>$ 3 meses de idade					
11	05 m	1037	24	23,14 por mil	2,31 %
12	05 m	1011	26	25,71 por mil	2,57 %
13	07 m	1007	11	10,92 por mil	1,09 %
14	07 m	1026	15	14,61 por mil	1,46 %
15	08 m	871	23	26,40 por mil	2,64 %
16	09 m	1001	20	19,98 por mil	1,99 %
17	10 m	1033	16	15,48 por mil	1,54 %
18	11 m	1014	19	18,73 por mil	1,87 %
19	12 m	1002	17	16,96 por mil	1,69 %

No pâncreas do controle 15 a quantidade de células β encontrada foi < 1000 células portanto o cálculo do percentual foi proporcional e não absoluto

Tabela 10: Valores médios de % Ki-67-LI nos controles e nos pacientes com a forma difusa do CHI de acordo com a idade

	<i>Idade</i>	Valores médios de % Ki-67-LI ± DP		<i>n</i>
		% Ki-67-LI	± DP	
Controles	≤ 3 meses	1,85	± 0,37	10
	> 3 meses	1,90	± 0,52	9
	Total	1,87	± 0,44 *	19
Pacientes CHI Difuso	≤ 3 meses	2,41	± 0,45	2
	> 3 meses	2,42	± 0,40	8
	Total	2,41	± 0,38 *	10

* $P = 0,009$

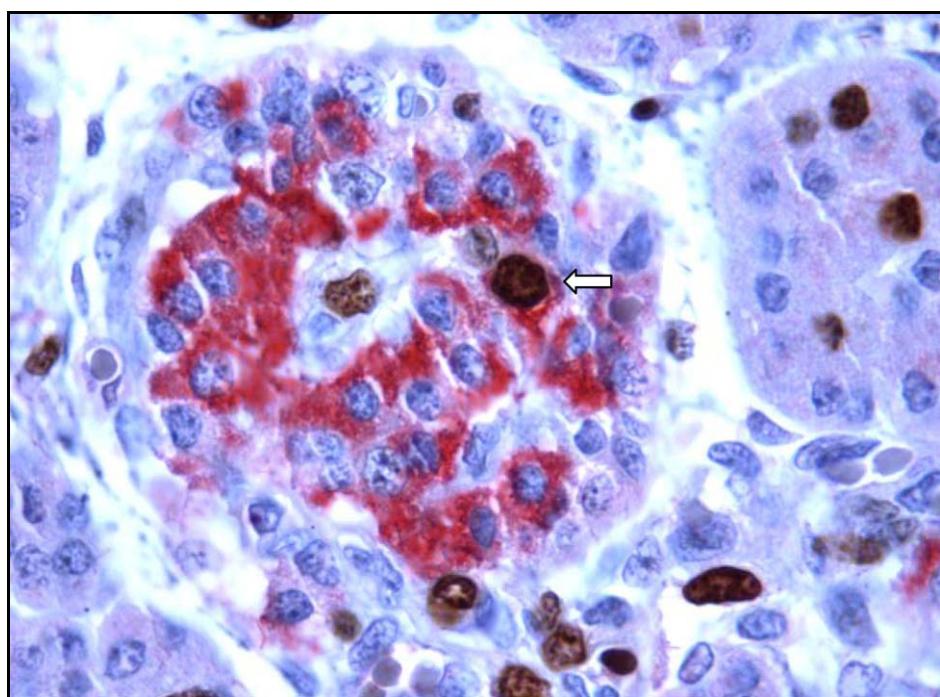


Figura 17: Controle (9 m) – célula β em proliferação – (Ki-67-LI = 1,99%)
(IHQ – insulina/Permanent Red e Ki-67/DAB – 1000X)

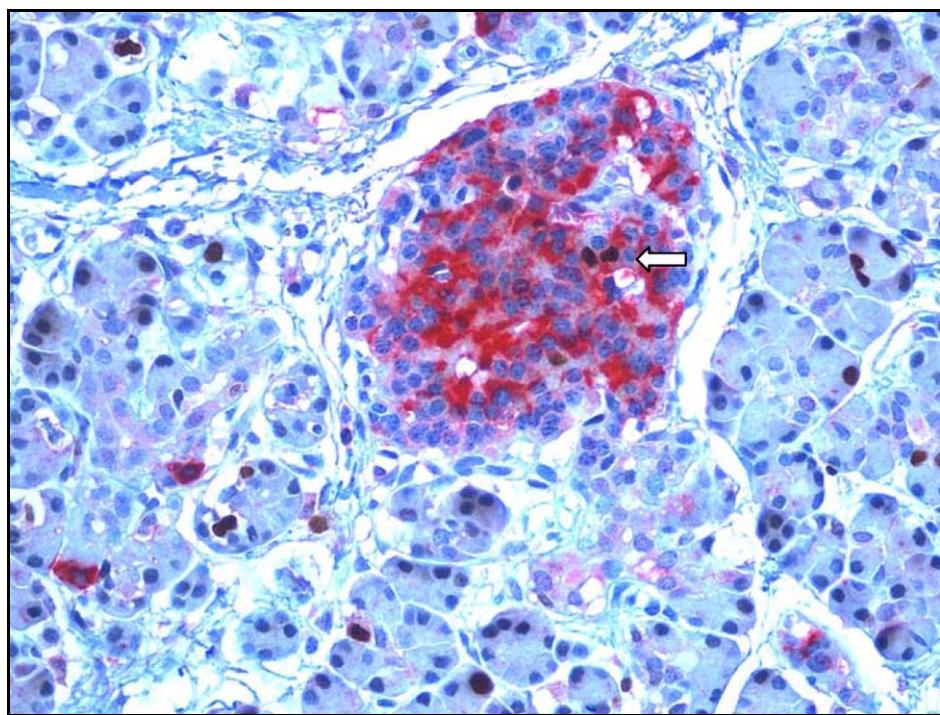


Figura 18: CHI-Difuso (12m) – células β em proliferação – (Ki-67-LI = 3,57%) (IHQ – insulina/Permanent Red e Ki-67/DAB – 400X)

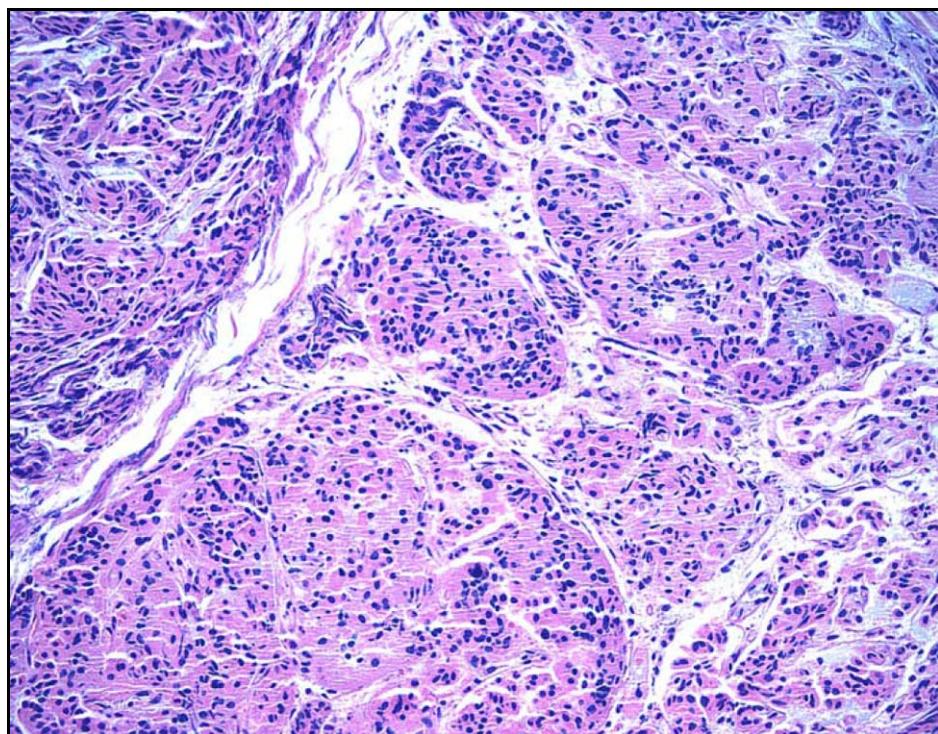


Figura 19: CHI-Focal (10 m) – área focal adenomatosa (H&E – 100X)

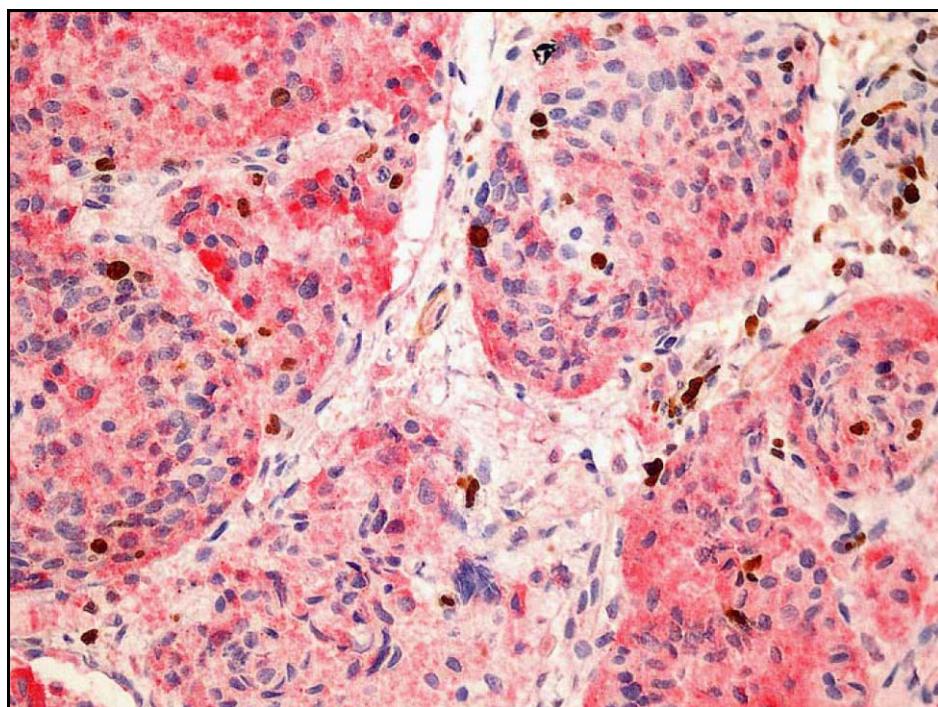


Figura 20: CHI-Focal (10 m) – área focal adenomatosa com alto índice proliferativo das células β (Ki-67-LI = 10,15%) (IHQ – insulina/Permanent Red e Ki-67/DAB – 400X)

O gráfico (**Figura 30**) mostra a distribuição dos valores de % Ki-67-LI nas diferentes faixas etárias, consideradas em ambos os grupos, controle e com CHI, com uma nítida tendência dos valores dos controles localizarem-se à esquerda (< % Ki-67-LI) e dos pacientes à direita (> % Ki-67-LI), sem diferença evidente em relação aos grupos etários em ambos, pacientes e controles.

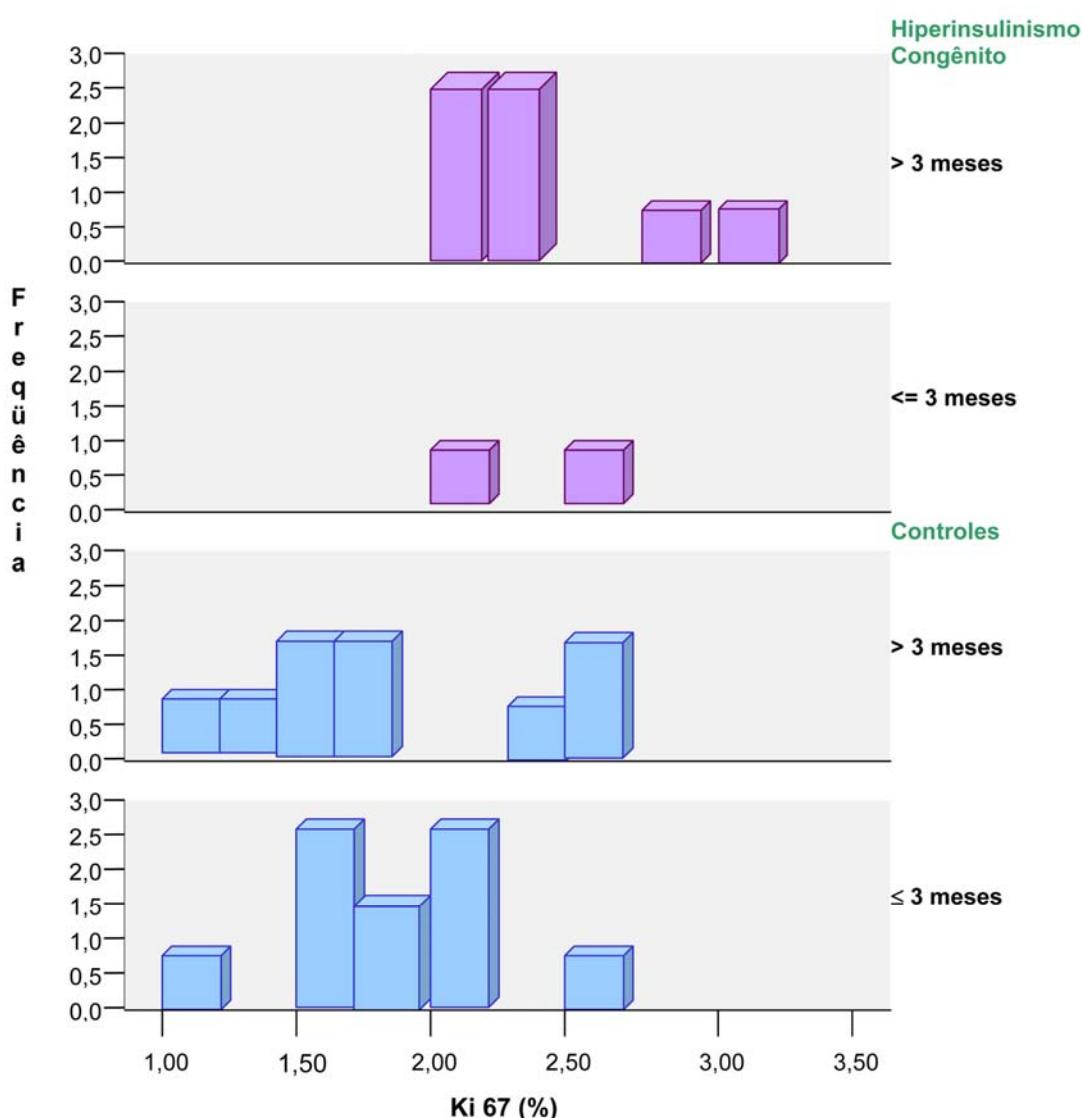


Figura 30: Gráfico da frequência do índice de proliferação das células β (% Ki - 67 - LI) nos grupos etários de pacientes e controles

5.3.2 Aspectos imuno-histoquímicos das proteínas SUR 1 e Kir 6.2 dos canais K^{ATP}

O padrão de reação IHQ dos anticorpos SUR 1 e Kir 6.2 foi citoplasmático granular nos pacientes e nos controles, não sendo observado padrão de membrana.

O exame imuno-histoquímico com o anticorpo Kir 6.2 resultou positivo difuso nas células endócrinas das ilhotas de 10/11 pacientes e positivo focal em 1/11 paciente (**Figuras 31, 33 e 34**). O exame imuno-histoquímico com o anticorpo SUR 1 resultou positivo difuso em 4/4 pacientes (**Figura 32**), e a reação com SUR 1 dos 7 pacientes restantes não foi considerada satisfatória para avaliação.

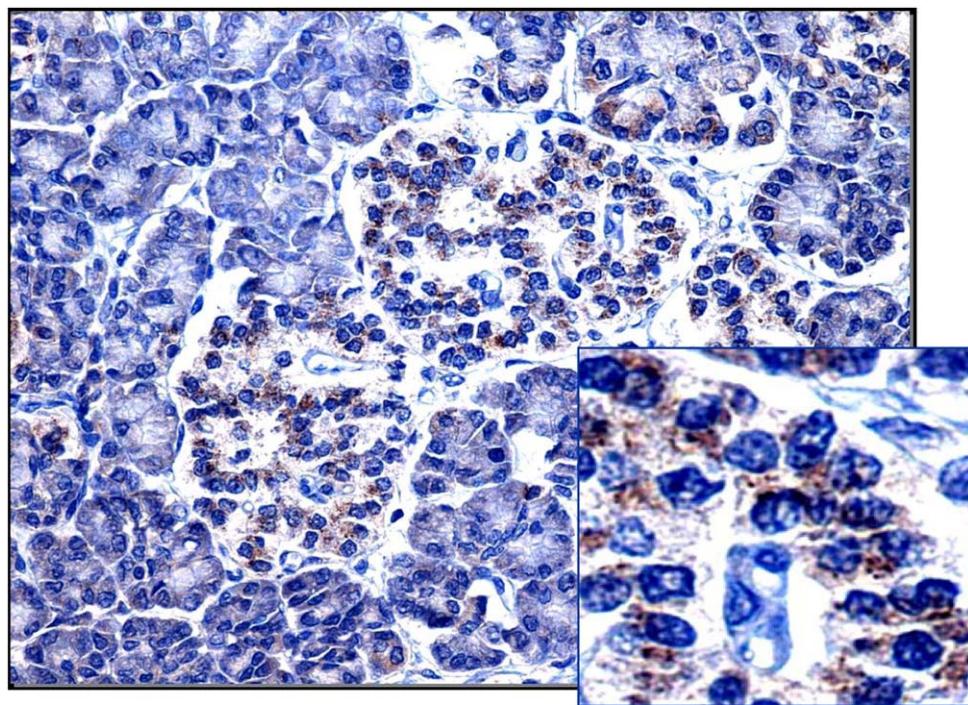


Figura 31: CHI-Difuso (7 m) – subunidade proteica Kir 6.2 dos canais K+ / ATP das células β (IHQ – Kir 6.2 – 400X)

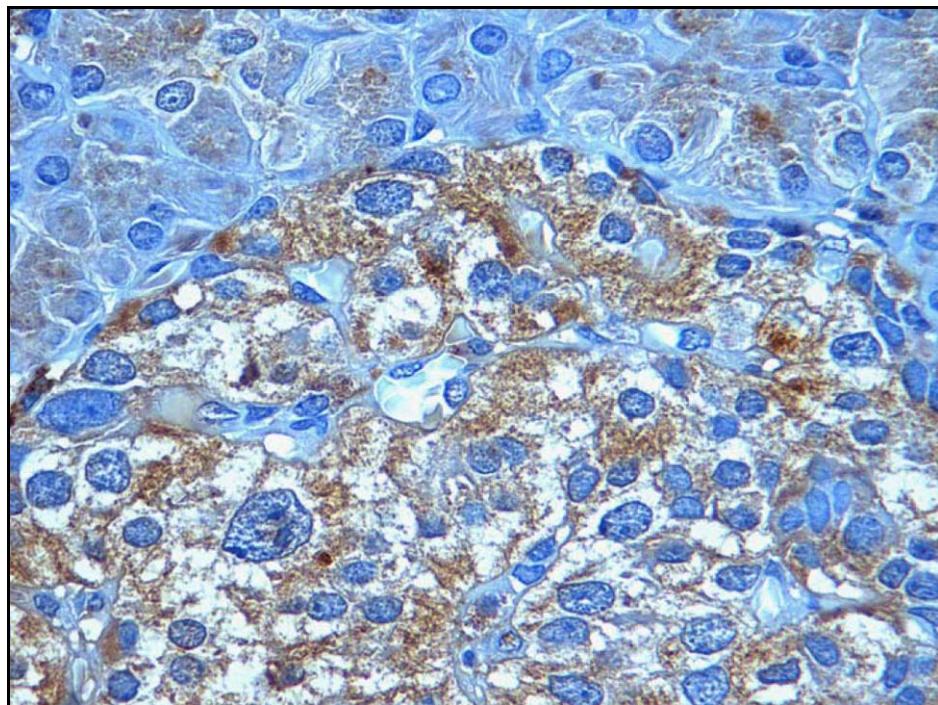


Figura 32: CHI-Difuso (6 m) – subunidade proteica SUR 1 dos canais K+ / ATP das células β (IHQ – SUR 1 – 1000X)

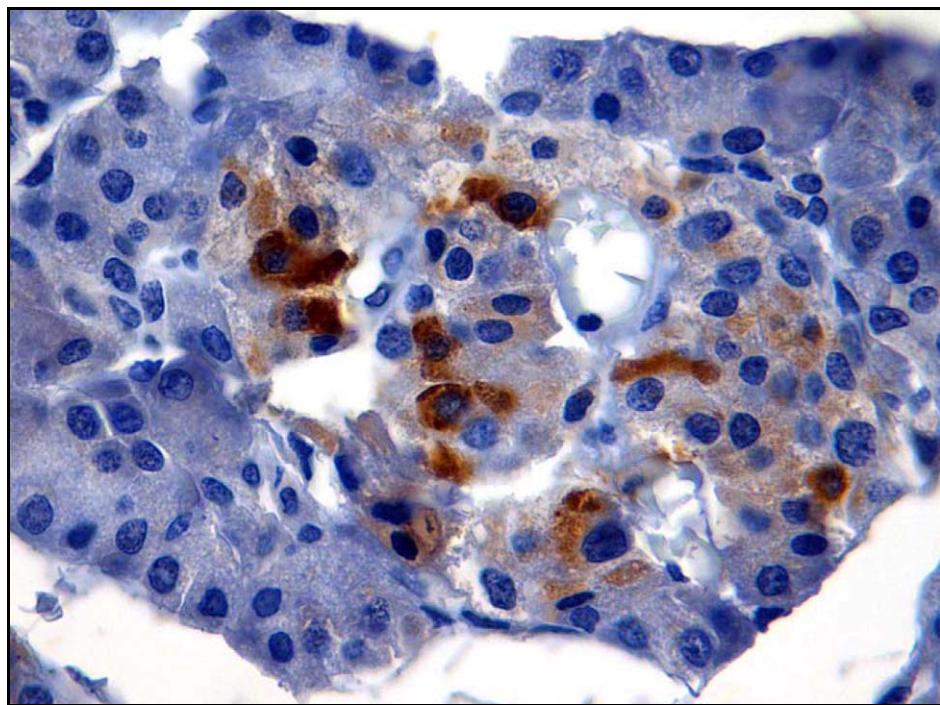


Figura 33: CHI-Difuso (4 m) – subunidade proteica Kir 6.2 dos canais K+ / ATP das células β (IHQ – Kir 6.2 – 1000X)

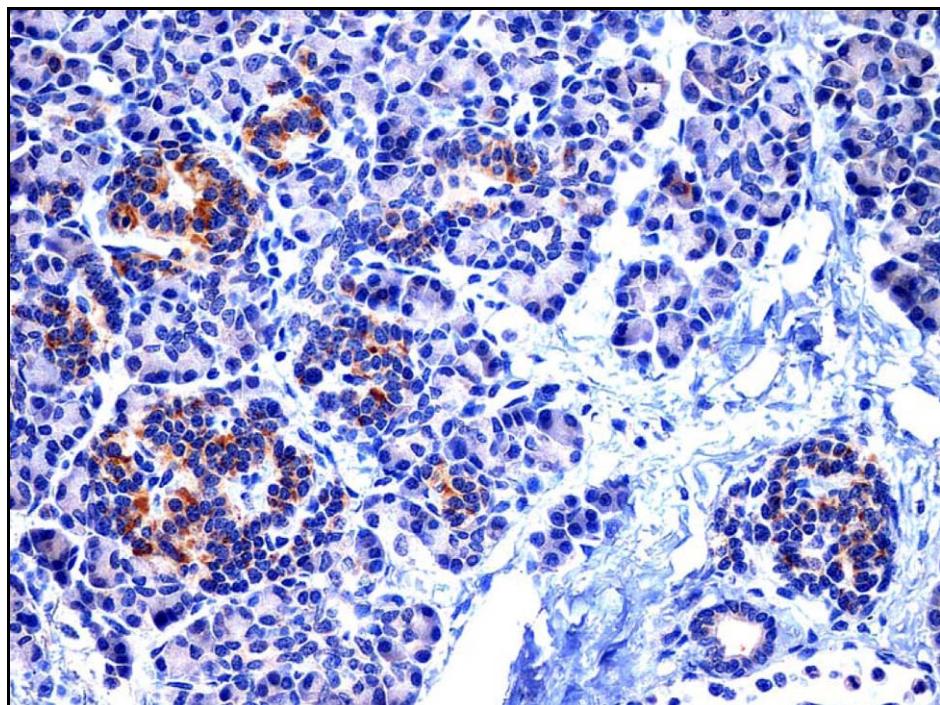


Figura 34: CHI-Difuso (4 m) – subunidade proteica Kir 6.2 dos canais K+ / ATP das células β (IHQ – Kir 6.2 – 200X)

5.3.3 Aspectos genético-moleculares dos genes *ABCC8* (SUR 1) e *KCNJ11* (Kir 6.2)

O exon único do gene *KCNJ11* (Kir 6.2) apresenta 14 polimorfismos conhecidos (SNPs). O sequenciamento automático dos produtos amplificados referentes a este gene em DNA genômico de sangue periférico dos 4 pacientes detectou a presença de homozigose para 13 dos 14 polimorfismos conhecidos. A única situação de heterozigose (C/T) foi observada para o SNP rs5218 em 2 pacientes (irmãs) sendo a mãe homozigota para o alelo C. Os alelos encontrados para cada SNP podem ser visualizados na **TABELA 11**. Nenhuma mutação e/ou novo polimorfismo foi observado na análise exônica do gene *KCNJ11* (Kir 6.2) em DNA genômico de sangue periférico destes 4 pacientes.

Para a região do gene *ABCC8* (SUR 1) que foi analisada (exons 33-37) existem 4 polimorfismos previamente identificados. Os alelos presentes na análise do DNA genômico nesses 4 pacientes constam na **TABELA 12**. Os resultados desta análise não identificaram nenhuma mutação e/ou polimorfismo não descrito. DNA genômico de outros 6 pacientes foi extraído do tecido incluído em parafina e foi realizada análise genética somente do gene *ABCC8* (SUR 1) que também não evidenciou mutações e/ou novos polimorfismos.

Tabela 11: Resultado do sequenciamento automático para o exon único do gene *KCNJ11* (Kir 6.2). Alelos presentes para cada *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)

Nucleotídeo	Alelo	Caso 5 gêmea	Caso 8 gêmea	Mãe gêmeas	Caso 9	Caso 11	Mãe Caso 11
rs41309072	G/C	C	C	C	C	C	C
rs5219	A/G	G	G	G	G	G	G
rs41314517	T/C	T	T	T	T	T	T
rs28936678	T/C	T	T	T	T	T	T
rs5218	C/T	C/T	C/T	C	T	T	T
rs5217	G/A	G	G	G	G	G	G
rs5216	C/G	C	C	C	C	C	C
rs1800467	C/G	C	C	C	C	C	C
rs1800854	C/A	C	C	C	C	C	C
rs5215	G/A	A	A	A	A	A	A
rs5214	A/G	A	A	A	A	A	A
rs35043381	C/-	C	C	C	C	C	C
rs8175351	G/A	G	G	G	G	G	G
rs41282930	C/G	C	C	C	C	C	C

Tabela 12: Resultado do sequenciamento automático para os exons 33-37 do gene *ABCC8* (SUR 1). Alelos presentes para cada *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)

Nucleotídeo	Alelo	Caso 5 gêmea	Caso 8 gêmea	Mãe gêmeas	Caso 9	Caso 11	Mãe Caso 11
rs1129799	G/A	G	G	G	G	G	G
rs28936370	G/C	G	G	G	G	G	G
rs757110	G/T	T	T	T	T	T	T
rs28938469	C/T	C	C	C	C	C	C

6 DISCUSSÃO

O hiperinsulinismo congênito (CHI) é um distúrbio heterogêneo do pâncreas endócrino cujo diagnóstico depende da análise dos parâmetros clínicos, laboratoriais, genético-moleculares e histopatológicos.

Devido ao seu aspecto genético, existem diferenças epidemiológicas da doença em diferentes populações mundiais, que variam de acordo com o grau de consanguinidade nas formas familiares, assim diversos países desenvolveram estudos com seus pacientes em busca de novas mutações que esclareçam a patogênese da doença (*Nestorowicz et al., 1996; Jack et al., 2000; Tanizawa et al., 2000; Ohkubo et al., 2005; Fernández-Marmiesse et al., 2006; Biagiotti et al., 2007; Taguchi et al., 2007*). Este foi um dos nossos objetivos ao estudar o CHI em crianças brasileiras.

Nossos pacientes portadores de CHI apresentaram comportamento clínico similar ao descrito na literatura em relação à sintomatologia e ao prognóstico. Os dados clínicos mostram que todos os nossos pacientes, 7 meninas e 4 meninos, dos quais 5 são filhos de pais consangüíneos, tiveram convulsões secundárias à hipoglicemia acentuada com níveis elevados de insulina. Não houve resposta ao tratamento clínico com diazóxido e os 11 pacientes foram submetidos a pancreatectomia com idades entre 26 dias e 13 meses, cuja extensão da cirurgia variou de 85% a 98%. Sete pacientes (63,6%) evoluiram com diabetes mellitus sendo que as 2 gêmeas desenvolveram diabetes somente na adolescência. Cinco (45,4%)

apresentaram retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor. O alto índice de diabetes iatrogênico relatado na literatura, ocorre com maior freqüência em pacientes que sofreram mais de uma cirurgia (**Leibowitz et al., 1995; Meissner et al., 2003**). O exame histopatológico do pâncreas revelou 10 casos com a forma difusa e 1 caso com a forma focal do CHI.

A habilidade em diferenciar as duas formas do CHI é fundamental em virtude da diferença radical do tratamento cirúrgico: pancreatectomia quase-total na forma difusa e apenas exerese do foco adenomatoso, em média medindo 4,5 mm (**Rahier et al., 1998**) na forma focal, e as conseqüentes implicações no prognóstico da forma focal: exerese do foco adenomatoso com cura total x pancreatectomia quase-total desnecessária associada ao diabetes iatrogênico permanente.

No Brasil, a tomografia computadorizada por emissão de pósitrons com [¹⁸F]-L-dopa (*[¹⁸F]-L-Dopa PET-TC scan*) e a análise genético-molecular dos genes dos canais K^{ATP} não são disponíveis para fins diagnósticos, e portanto o exame intra-operatório de congelação pode ajudar na distinção entre as duas formas do CHI e orientar a extensão da pancreatectomia. Segundo **Suchi et al., 2004**, a nucleomegalia das células β é o critério mais específico para o diagnóstico de congelação da forma difusa, pois está ausente na forma focal, e é difusa no pâncreas da forma difusa, portanto poucas amostras de pâncreas seriam suficientes na congelação. Entretanto, mais recentemente este mesmo autor refere casos com a forma difusa do CHI, porém apresentando nucleomegalia apenas focal, maior idade e ausência de mutações nos genes ABCC8 e KCNJ11 dos canais K^{ATP}, e

sugere uma terceira classificação para estes pacientes (LINE – *Localized Islet cell Nuclear Enlargement*) (**Suchi et al., 2007 - abstract**).

A nucleomegalia, definida como > 3 vezes o núcleo das células endócrinas adjacentes (**Smith et al., 2001; Suchi et al., 2004**), foi observada em 54,5% dos nossos pacientes com CHI difuso, e esteve ausente nos controles, o que confirma este critério como o mais específico da forma difusa. Entretanto, a nucleomegalia não esteve presente em 45,5% dos nossos casos, deixando de contribuir para o diagnóstico histológico, e dificultando principalmente o exame intra-operatório de congelação, circunstância em que a presença de nucleomegalia é preditiva da forma difusa. Este critério, também observado em recém-nascidos de mães diabéticas (**Rahier et al., 1984; Ariel et al., 1988**)*, é considerado um parâmetro funcional (**Zerbini et al., 1994**) por traduzir a hiperfunção das células β (**Rahier et al., 1998; Sempoux et al., 1998**). O citoplasma aumentado destas células, representando aumento na quantidade de grânulos de insulina, também tem sido considerado um critério funcional (**Rahier et al., 1998; Sempoux et al., 1998; Suchi et al., 2003 e 2004**).

Todos os demais parâmetros histológicos foram observados nos pacientes e nos controles, indicando que, mais provavelmente, representam o processo normal de maturação do pâncreas endócrino, que envolve a diferenciação das células β a partir de células epiteliais dos ductos exócrinos, e a migração, destas células β recém formadas, para a região centro-acinar, como indicam estudos de embriogênese pancreática

* Apud Dunne et al., 2004

(**Bowens et al., 1997 e 1998**). Entretanto, no nosso estudo, enquanto a presença de ilhotas em septos fibrosos lobulares e de células β isoladas e espalhadas (*spreading*), que representam o fenômeno de migração, foi mais freqüentemente observada nos controles ≤ 3 meses de idade, mas ambos os critérios estavam presentes também nos pacientes com CHI difuso > 3 meses de idade, refletindo um retardado da maturação das células β , ao menos no subgrupo dos pacientes com a forma difusa.

No passado, pensava-se que os recém-nascidos portadores de CHI apresentassem uma anormalidade do desenvolvimento embriológico do pâncreas, associada à persistência de agregados de células endócrinas, das ilhotas de Langerhans, adjacentes ao epitélio dos ductos exócrinos, como se estivessem “brotando” destes ductos (complexo díctulo-insular, também conhecido como *nesidioblastose*), porém estudos imuno-histoquímicos demonstraram que esta é uma característica histológica frequente em crianças e recém-nascidos normoglicêmicos, e que a nesidioblastose, isoladamente, não pode ser considerada um critério histológico do CHI (**Sempoux et al., 1998; Rahier et al., 2000**).

Dois estudos prévios avaliaram a proliferação das células β no CHI, utilizando dupla marcação imuno-histoquímica com insulina e Ki-67 (**Sempoux et al., 1998; Kassem et al., 2000**), e um deles refere um aumento estatisticamente significativo da proliferação das células β na forma difusa do CHI (**Kassem et al., 2000**). No nosso estudo, foi constatado aumento do índice proliferativo das células β tanto nos pacientes com a forma focal como com a forma difusa quando comparados aos controles

normais ($P < 0,05$). Estes resultados confirmam os achados de **Kassem et al.** que refere diferenças no índice proliferativo dos recém-nascidos ≤ 3 meses em relação àqueles > 3 meses. Não houve diferença do índice de proliferação das células β entre os dois grupos etários (≤ 3 meses e $3 >$ meses) na nossa casuística (casos e controles).

Na forma focal, a deleção somática do alelo materno do locus 11p15 nas células da área focal adenomatosa, que, segundo recente referência (**Damaj et al., 2008**) também pode estar associada à dissomia uniparental com duplicação do alelo paterno, é consistente com uma lesão proliferativa monoclonal causada por um desequilíbrio da expressão dos genes localizados neste locus herdados da mãe e do pai. Este locus apresenta um conjunto de genes que sofrem imprinting parental, entre eles o *IGF-2* (*Insulin-like Growth Factor 2*) fator de crescimento semelhante à insulina 2 que é transcrito a partir do alelo paterno, e os genes *H19* e *p57^{kip2}* (*CDKN1C*) que são genes supressores tumorais expressos pelo alelo materno. O produto do gene *H19* é um micro RNA que atua como silenciador do *IGF-2* e portanto regula este fator de crescimento. O *p57^{kip2}* (*CDKN1C*) atua na regulação da proliferação interrompendo o ciclo celular (**Verkarre et al., 1998; Fournet et al., 2001; Kassem et al., 2001; Suchi et al., 2006; Damaj et al., 2008**). As células β da(s) área(s) adenomatosa(s) na forma focal do CHI, apresentam ausência do alelo materno no locus 11p15 e consequente silenciamento da ação dos genes supressores de tumor, associada à duplicação do alelo paterno com hiper-expressão do gene *IGF-2* (**Damaj et al., 2008**) e/ou presença de mutações nos genes *SUR 1* e *Kir 6.2* do alelo paterno.

Este evento genético pode explicar, ao menos em parte, nosso dado de grande aumento do índice proliferativo das células β na área adenomatosa da forma focal quando comparado aos controles normais pareados por idade.

No paciente com a forma focal, em acordo com a literatura (**Sempoux et al., 1998; Kassem et al., 2000**), o índice de células β em proliferação (%Ki-67-LI), dentro da área focal adenomatosa, foi cerca de 10 vezes maior (10,15 %) do que no tecido pancreático adjacente (1,59 %), cujo índice foi similar ao grupo controle. Este dado foi considerado um critério histológico útil para diferenciar áreas adenomatosas da forma focal de áreas de *agregados frouxos de ilhotas*, muito semelhantes, observados em dois pacientes com a forma difusa e em uma amostra de pâncreas controle. Nos *agregados frouxos de ilhotas*, o %Ki-67-LI foi muito menor, em níveis semelhantes aos encontrados nos pâncreas da forma difusa. Nos dois pacientes portadores de CHI difuso com *agregados frouxos de ilhotas*, o pâncreas remanescente não apresentou nenhuma alteração. Este dado reitera a importância do %Ki-67-LI no diagnóstico diferencial entre os *agregados frouxos de ilhotas* do CHI difuso e os focos adenomatosos do CHI focal, pois em ambos os casos o pâncreas remanescente não mostrou alterações. Talvez, a incidência elevada de CHI-focal, referida na literatura (cerca de 40%), tenha sido superestimada em virtude da inclusão de casos de CHI difuso com *agregados frouxos de ilhotas*, identificados em nossa casuística somente através da IHQ com insulina/Ki-67.

Portanto, nossos resultados nos levam à proposição de incluir a avaliação da atividade proliferativa (%Ki-67-LI) como critério para definir a

forma focal. Esta proposta se apóia nos estudos da patogênese molecular da forma focal, que mostram deleção de genes reguladores do ciclo celular. A avaliação da presença dessa deleção nas áreas adenomatosas do único caso de CHI focal e nas 3 amostras de pâncreas com *agregados frouxos de ilhotas*, após microdissecção e utilização da técnica de pesquisa de microssatélites, foi realizada em nosso estudo, porém não forneceu resultados satisfatórios pela dificuldade de amplificação do DNA extraído do pâncreas nessas áreas.

Na forma difusa, o aumento do índice proliferativo foi menos acentuado, porém ainda assim estatisticamente maior do que aquele dos controles. O mecanismo subjacente à proliferação na forma difusa não está bem esclarecido. Não pode ser afastada a possibilidade deste aumento do %Ki-67-LI representar um aspecto da regeneração do pâncreas endócrino, considerando-se que, 9/11 dos pacientes com CHI difuso foram submetidos a uma segunda cirurgia, e estudos realizados em animais, demonstraram atividade regenerativa exócrina e endócrina no pâncreas após pancreatectomia de 90% (**Bouwens et al., 2005; Berrocal et al., 2005**). O argumento contrário a esta hipótese, está no fato de que, o valor do %Ki-67-LI da 1^a cirurgia de cada um dos nossos pacientes, ter sido também superior ao valor médio do %Ki-67-LI dos controles.

Os canais de membrana K^{ATP} das células β , responsáveis pela secreção de insulina, são constituídos exclusivamente pelas proteínas SUR 1 e Kir 6.2 codificadas respectivamente pelos genes *ABCC8* e *KCNJ11* localizados no locus 11p15.

Na última década, grandes avanços foram alcançados quanto à compreensão da patogênese genética e molecular do CHI, principalmente em relação a esses dois genes. Revisões recentes (**Gloyn et al., 2006; Yan et al., 2007**) em pacientes com CHI, descrevem 92 diferentes mutações no gene da proteína SUR 1 e cerca de 12 mutações no gene da proteína Kir 6.2 (**ANEXOS A e B**), porém apenas 11 mutações no *SUR 1* e 8 mutações no *Kir 6.2* foram registradas no *Ensembl Human Gene Mutation Data Base* (www.ensembl.org).

Apenas 10-15 % dos casos de CHI são causados por mutações no gene *KCNJ11* e mutações no gene *ABCC8* são a causa de 50-60 % dos casos. Aproximadamente 60% destas mutações, incluindo as dos tipos *splice-site*, *missense*, *nonsense*, inserções e deleções, encontram-se concentradas na região dos exons 33-39 do gene *ABCC8* que codifica o NBF-2 (*Nucleotide Binding Fold 2*), um dos dois sítios de ligação do ATP na proteína SUR 1, responsável por ativar (fechar) os canais K^{ATP} das células β do pâncreas e desencadear a secreção de insulina (**Fournet et al., 2003**). Esta região, altamente preservada neste gene, é considerada essencial para o funcionamento do canal, e por esta razão, foi selecionada para a investigação neste trabalho.

Não foram encontradas mutações ou novos polimorfismos nos exons 33-37 do gene *ABCC8* e no único exon do gene *KCNJ11* em nenhum dos nossos pacientes, incluindo aquele com a forma focal. Apesar da ausência de identificação de mutações, referida na literatura em cerca de 50% dos casos de CHI (**Dunne et al., 2004**), a análise funcional das células β sem mutações identificáveis nos genes *SUR 1* e *KiR 6.2* demonstrou ausência de atividade dos canais K^{ATP} e ausência de resposta clínica ao tratamento com

diazóxido, que atua sobre estes canais. Esta disfunção pode ser determinada por diversos fatores incluindo alterações das proteínas com efeito regulador na expressão dos genes dos canais K^{ATP} (fatores de transcrição gênica), alterações da síntese protéica ou do mecanismo de formação estrutural tridimensional das proteínas SUR 1 e Kir 6.2, alterações no transporte dos canais K^{ATP} do retículo endoplasmático até a superfície da membrana, alterações de condutibilidade do potássio através dos canais (**Dunne et al., 2004**) e até mesmo alterações na quantidade destes canais na superfície de membrana (**Sivaprasadarao et al., 2007**), pois atualmente sabe-se que os canais K^{ATP} estão presentes principalmente na superfície da membrana secretora dos grânulos de insulina dentro do citoplasma das células β , e estão envolvidos diretamente no armazenamento e na secreção destes grânulos (**Geng et al., 2003**).

A presença de canais K^{ATP} na superfície da membrana dos grânulos intra-citoplasmáticos de insulina, conforme estudo realizado com co-expressão de insulina/SUR 1 e insulina/Kir 6.2 através de imuno-fluorescência e microscopia imuno-eletrônica (**Geng et al., 2003**), explica o fato do exame imuno-histoquímico com SUR 1 e Kir 6.2 no pâncreas dos nossos pacientes, ter resultado positivo com padrão citoplasmático granular. Essas proteínas também estão presentes nas células α que produzem glucagon, e para diferenciá-las das células β foi realizada IHQ de dupla marcação com isulina/SUR 1 e insulina/Kir 6.2, realizada em apenas uma referência da literatura (**Nielsen et al., 2007**), porém o fato dos dois marcadores apresentarem padrão de imuno-expressão no mesmo compartimento (citoplasmático), dificultou a interpretação das reações.

Dados de revisão da literatura referem que o sequenciamento de todos os 39 exons do gene *ABCC8* (SUR 1) e do único exon do gene *KCNJ11* (Kir 6.2) não encontrou mutações, e portanto não pôde definir a patogênese genética do CHI, em mais de 50% dos pacientes com a forma difusa e em cerca de 30% daqueles com a forma focal (**De Lonlay et al., 2002; Suchi et al., 2004; Tornovsky et al., 2004; Hussain, 2005; Fernández-Marmiesse et al., 2006**).

Esta alta percentagem de achados negativos no *screening* das mutações dos genes *ABCC8* e *KCNJ11* em pacientes com CHI, sugere a necessidade de ampliar a pesquisa genética, incluindo a investigação epigenética dos genes reguladores que controlam as taxas de transcrição do DNA (fatores de transcrição) e orientam a expressão gênica envolvida no mecanismo de secreção da insulina. (**Sund et al., 2001; Wang et al., 2002; Meissner et al., 2004; Melloul et al., 2004**).

Embora nossas informações sobre os aspectos genéticos desta doença, em nosso meio, foram determinadas pelo pequeno número de casos nos últimos 20 anos devido à raridade do CHI, e o estudo ter avaliado 5 dos 39 exons do gene *ABCC8* (SUR 1), sua relevância reside no fato de ser o primeiro estudo genético de pacientes com hiperinsulinismo congênito no Brasil. Esperamos que estes resultados possam ser o ponto inicial de futuros estudos prospectivos multi-institucionais que possam contribuir para o melhor entendimento desta complexa doença, possibilitando uma abordagem terapêutica mais adequada.

7 CONCLUSÕES

- Nossos pacientes portadores de CHI apresentaram comportamento clínico similar ao descrito na literatura em relação à sintomatologia e ao prognóstico.
- A nucleomegalia das células β ocorreu em metade dos pacientes com a forma difusa do CHI e não ocorreu em nenhum dos controles, confirmando sua especificidade como critério histológico para o diagnóstico da forma difusa.
- Os outros parâmetros histológicos, incluindo a “*nesidioblastose*”, foram observados em ambos, pacientes e controles da mesma faixa etária, indicando que sua presença faz parte do processo de maturação normal do pâncreas endócrino, que envolve a diferenciação das células β a partir de células epiteliais dos ductos exócrinos do pâncreas, e a migração destas células recém formadas para a região centro-acinar.
- Houve um aumento, estatisticamente significativo, do índice de proliferação das células β produtoras de insulina nas formas difusa e focal do CHI em comparação aos controles da mesma faixa etária.

- A realização de IHQ de dupla marcação (insulina/Ki-67) pode contribuir para o diagnóstico diferencial histológico entre o(s) foco(s) adenomatoso(s) da forma focal e as áreas de *agregados frouxos de ilhotas*, observadas na forma difusa.
- Não foram constatadas mutações ou novos polimorfismos no gene *ABCC8* (SUR 1) (exons 33-37) e no gene *KCNJ11* (Kir 6.2) (exon único) nos pacientes estudados.

8 ANEXOS

ANEXO A: Mutações no gene ABCC8 (SUR 1) dos canais K+ / ATP no CHI
Gloyn et al., 2006 (revisão)

Localização	Tipo de mutação	Nucleotídeo	Efeito na proteína	Referência	Prova funcional da mutação
Promotor	Promotor	- 64 CG		Tornovsky et al. 2004	Tornovsky et al 2004
Exon 2	Missense	c.209 G > A	G 70 E	Tornovsky et al. 2004	Tornovsky et al. 2004
Exon 2	Missense	c.221 G > A	R 74 Q	Nestorowicz et al 1998	
Exon 2	Missense	c.220 C > T	R 74 W	Suchi et al 2003	
Exon 3	Missense	c.331 G > A	G 111 R	Tornovsky et al. 2004	Tornovsky et al. 2004
Exon 3	Missense	c.346 G > C	A 116 P	Nestorowicz et al 1998	
Exon 3	Missense	c.375 C > G	H 125 Q	Nestorowicz et al 1998	Shyng et al. 1998
Exon 4	Missense	c.499 G > C	V 167 L	Fournet et al. 2001	
Exon 4	Missense	c.560 T > A	V 187 D	Otonkoski et al. 1999	Otonkoski et al. 1999
Exon 4	Missense	c.563 A > G	N 188 S	Kassem et al. 2000; Nestorowicz et al. 1998	Shyng et al. 1998
Exon 5	Insertion	c.679_680ins18nt	NA	Aguilar-Bryan et al.1999	
Exon 5	Deletion	c.731_732 del A	NA	Aguilar-Bryan et al.1999	
Exon 5	Insertion	NA	L 226 ins 5aa	Aguilar-Bryan et al.1999	
Exon 5	Nonsense	c.742 C > T	R 248 X	Aguilar-Bryan et al.1999	
Exon 6	Frame-shift	c.949 del C	317 fs / ter	Kassem et al. 2000; Nestorowicz et al. 1998	
Intron 7	Splice site	c.1176-53 del GTG	Aberrant splicing	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 8	Missense	c.1216 A > G	N 406 D	Nestorowicz et al 1998	
Exon 8	Missense	c.1252 T > C	C 418 R	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 8	Insertion	c.1260_1261 ins31		Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 9	Frame-shift	NA	I 446 fs del T	Tanizawa et al. 2000	Tanizawa et al. 2000

Continua...

Continuação Anexo A

Localização	Tipo de mutação	Nucleotídeo	Efeito na proteína	Referência	Prova funcional da mutação
Exon 10	Missense	c.1523 T > C	L 508 P	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Intron 10	Splice site	c.1630 + 1G > T	Aberrant splicing	Kassem et al. 2000 ; Nestorowicz et al. 1998	
Exon 11	Deletion	c.1580_1581 delG		Fournet et al. 2001	
Exon 11	Splice site	c.1631-20 A > G	Aberrant splicing	Thomas et al. 1996-b	
Exon 11	Splice site	c.1671-20 A to G	Aberrant splicing	Thomas et al. 1996-b	
Intron 11	Splice site	c.1818-20 A > G	Aberrant splicing	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 12	Missense	c.1773 C > G	F 591 L	Nestorowicz et al. 1998	Shyng et al. 1998
Exon 12	Nonsense	c.1792 C > T	R 598 X	Suchi et al. 2003	
Exon 13	Deletion	c.1874_1875 del C		Suchi et al. 2003	
Exon 13	Deletion	c.1879_1880 del C		Glaser et al. 2000	
Exon 13	Deletion	c.1885_1886 del C		Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 13	Missense	c.1858 C > T	R 620 C	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 13	Frame-shift	c.1893_1894 del T	631 fs / ter	Nestorowicz et al 1998	
Intron 15	Splice site	c.2116+1 G > T	Aberrant splicing	Suchi et al. 2003	
Intron 15	Splice site	c.2154+3 A > G	Aberrant splicing	Tornovsky et al. 2004	Straub et al. 2001
Exon 16	Splice site	c.2117-1 G > A	Aberrant splicing	Nestorowicz et al. 1998	
Exon 16	Missense	c.2147 G > T	G 716 V	Meissner et al. 1999 ; Thomas et al. 1996-b	
Exon 16	Nonsense	c.2151 C > A	C 717 X	Suchi et al. 2003	
Intron 18	Splice site	c.2291-1 G > A	Aberrant splicing	Thomas et al. 1996-b	
Intron 18	Splice site	c.2295-1 G > A	Aberrant splicing	Thomas et al. 1996-b	
Intron 18	Splice site	c.2295-20 G > A	Aberrant splicing	Aguilar-Bryan et al. 1999	

Continua...

Continuação Anexo A

Localização	Tipo de mutação	Nucleotídeo	Efeito na proteína	Referência	Prova funcional da mutação
Exon 21	Nonsense	c.2509 C > T	R 837 X	Aguilar-Bryan et al. 1999; Tornovsky et al. 2004	Tornovsky et al. 2004
Exon 22	Missense	c.2524 C > G	R 842 G	de Lonlay-Debeney et al. 1999; Fournet et al. 2001	
Exon 22	Frame-shift	NA	872 fs / ter	Fournet et al. 2001	
Exon 22	Missense	c.2669 A > C	K 890 T	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Intron 22	Splice site	c.2694+3 G > C		Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 24	Nonsense	c.2860 C > T	Q 954 X	Meissner et al. 1999; Nestorowicz et al. 1998	
Exon 24	Missense	c.2870 C > T	S 957 F		
Exon 25	Nonsense	c.2995 C > T	R 999 X	Suchi et al. 2003	
Exon 25	Deletion	c.3130_3131del 20		Fournet et al. 2001	
Exon 26	Splice site	c.3165+1 G > A		Fournet et al. 2001	
Exon 27	Insertion	c.3339_3340 ins T	TTT TTT GAG>TTT TTT TGA	Tornovsky et al. 2004	
Exon 28	Missense	c.3416 C > T	T 1139 M	Nestorowicz et al. 1998	Shyng et al. 1998
Exon 28	Insertion / Deletion	c.3559_3562 del 4/ ins CGTG		Fournet et al. 2001	
Exon 29	Deletion	c.3576_3577 del G			
Exon 29	Missense	c.3644 G > A	R 1215 Q	Nestorowicz et al. 1998; Suchi et al. 2003	Shyng et al. 1998
Intron 29	Splice site	c.3653-1 G > T		Aguilar-Bryan et al. 1999	
Intron 32	Splice site		GGG AAG>GGG AAA		
Intron 32	Splice site	c.3992-9 G > A	Aberrant splicing	Kasssem et al. 2000; Meissner et al. 1999; Nestorowicz et al. 1998; Suchi et al. 2003; Thomas et al. 1995 (a)	Nestorowicz et al. 1996

Continua...

Continuação Anexo A

Localização	Tipo de mutação	Nucleotídeo	Efeito na proteína	Referência	Prova funcional da mutação
Intron 32	Splice site	c.3992-3 C > G	Aberrant splicing	Meissner et al. 1999; Nestorowicz et al. 1998	
Exon 33	Nonsense	c.4016 G > A	W 1339 X	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 33	Missense	c.4008 G > T/C	K 1337 N	Human Genome Mutation Database	
Exon 33	Missense	c.4028 G > A	G 1343 E	Tornovsky et al. 2004	Tornovsky et al. 2004
Exon 33	Missense	c.4058 G > C	R 1353 P	Aguilar-Bryan et al. 1999; Verkarre et al. 1998	
Exon 33	Missense	c.4058 G > A	R 1353 H	Huopio et al. 2002-b; Magge et al. 2004	Magge et al. 2004
Exon 33	Missense	c.4081 G > A	V 1361 M	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 34	Deletion	c.4138_4141 del CGAC		de Lonlay-Debeney et al. 1999; Fournet et al. 2001	
Exon 34	Missense	c.4135 G > C	G 1379 R	Nestorowicz et al. 1998	
Exon 34	Missense	c.4144 G > A	G 1382 S	Nestorowicz et al. 1998	Shyng et al. 1998
Exon 34	Deletion	c.4153_4145 del AG	Del AG	Fournet et al. 2001	
Exon 34	Deletion	c.4159_4161 del TCC	Del Ser 1387	Thornton et al. 2003	Thornton et al. 2003
Exon 34	Missense	c.4160 C > T	S 1387 F	Aguilar-Bryan et al. 1999; Nestorowicz et al. 1998;	Nestorowicz et al. 1998
Exon 34	Deletion	c.4162_4164 del TTC	F 1388 del	Kassem et al. 2000; Nestorowicz et al. 1998; Suchi et al. 2003	Shyng et al. 1998
Exon 34	Missense	c.4181 G > A	R 1394 H	Nestorowicz et al. 1996	Shyng et al. 1998
Exon 35	Deletion	c.4202-7_4206 del 12		Fournet et al. 2001	
Exon 35	Missense		G 1401 D (23)X	Aguilar-Bryan et al. 1999	

Continua...

Conclusão Anexo A

Localização	Tipo de mutação	Nucleotídeo	Efeito na proteína	Referência	Prova funcional da mutação
Exon 35	Missense	c.4256 G > A	R 1419 H	Tornovsky et al. 2004	Tornovsky et al. 2004
Exon 35	Missense	c.4261 C > T	R 1421 C	de Lonlay-Debeney et al. 1999; Fournet et al. 2001; Tanizawa et al. 2000; Verkarre et al. 1998	Tanizawa et al. 2000
Exon 35	Splice site	c.4310 G > A	Aberrant splicing	Tanizawa et al. 2000	Tanizawa et al. 2000
Exon 35 Missense Splice site	Nonsense Missense Splice site	c.4310 G > A	R 1437 Q (23)X, Aberrant splicing	Dunne et al. 1997; Verkarre et al. 1998	Dunne et al. 1997; Tanizawa et al. 2000
Exon 36	Missense	c.4372 G > A	A 1458 T	Nestorowicz et al. 1998	Reimann et al. 2003
Exon 36	Missense	c.4435 G > C	G 1479 R	Dunne et al. 1997; Thomas et al. 1995-a	Nichols et al. 1996
Intron 36	Splice site	c.4410_13G > A		Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 37	Missense	c.4477 G > A	A 1493 T	Kassem et al. 2000	
Exon 37	Missense	c.4481 G > A	R 1494 Q	Kassem et al. 2000; Suchi et al. 2003	
Exon 37	Missense	c.4480 C > T	R 1494 W	de Lonlay-Debeney et al. 1999; Fournet et al. 2001	
Exon 37	Insertion	c.4525insCGGCTT	1508 ins CGGCTT	Verkarre et al. 1998	
Exon 37	Missense	c.4516 G > A	E 1507 K	Aguilar-Bryan et al. 1999; Huopio et al. 2003/2000	Huopio et al. 2000
Exon 39	Missense	c.4652 T < A	V 1551 D	Huopio et al. 2002 (b)	Reimann et al. 2003
Exon 39	Missense	c.4651 C > G	L 1552 V	Huopio et al. 2002 (b)	Reimann et al. 2003
Exon 39	Missense	c.4631 T > C	L 1544 P	Aguilar-Bryan et al. 1999	
Exon 39	Missense	c.4663 G > A	G 1555 S	Fournet et al. 2001	

Os exons em verde (exons 33 a 37) foram seqüenciados nesta tese.

ANEXO B: Mutações no gene KCNJ11 (Kir 6.2) dos canais K^{ATP} no CHI
Gloyn et al., 2006 (revisão)

Localização	Tipo de Mutação	Nucleotídeo	Efeito na proteína	Referência	Prova funcional da mutação
5'		c.-54 C > T	Introduz novo <i>start codon</i>	Huopio et al. 2002 (a)	
5'		c.-134 G > T	Introduz novo <i>start codon</i>	Tornovsky et al. 2004	Tornovsky et al. 2004
Exon 1	Nonsense	c.36 C > A	Y 12 X	Kassem et al. 2000; Nestorowicz et al. 1997	
Exon 1	Missense	NA	K 67 N	Huopio et al. 2002 (b)	Reimann et al. 2003
Exon 1	Missense	c.271 T > G	W 91 R	Aguilar-Bryan et al. 1999	Aguilar-Bryan et al. 1999
Exon 1	Missense	c.401 G > C	G 134 A	Suchi et al. 2003	
Exon 1	Insertion	c.505 ins G		Fournet et al. 2001	
Exon 1	Missense	c.440 T > C	L 147 P	Thomas et al. 1996(a)	
Exon 1	Missense	c.560 C > T	A 187 V	Fournet et al. 2001	
Exon 1	Missense	c.761 C > T	P 254 L	Tornovsky et al. 2004	Tornovsky et al. 2004
Exon 1	Missense	c.776 A > G	H 259 R	Marthinet et al. 2005	Marthinet et al. 2005
Exon 1	Missense	c.797 C > T	P 266 L	Suchi et al. 2003	

O exon em verde (exon 1) foi seqüenciado nesta tese.

ANEXO C:**Protocolo de Coleta dos Dados Clínicos :**

Nº REGISTRO NO INSTITUTO DA CRIANÇA HC – FMUSP :

NOME :

DATA DE NASCIMENTO :

IDADE ATUAL :

SEXO :

CONSANGUINIDADE DOS PAIS :

PRÉ-NATAL: NÃO SIM

DIABETES MATERNO GESTACIONAL: NÃO SIM

PESO AO NASCER :

PREMATURIDADE : NÃO SIM - IDADE GESTACIONAL :

IDADE DOS PRIMEIROS SINTOMAS :

CONVULSÕES : NÃO SIM

ATRASO DO DESENVOLVIMENTO NEURO-PSICO-MOTOR : NÃO SIM

IDADE DO DIAGNÓSTICO DE HIPERINSULINISMO CONGÊNITO :

IDADE DA TRANSFERÊNCIA PARA O ICR - HC - FMUSP :

NÍVEIS DE REPOSIÇÃO DE GLICOSE P/ MANTER EUGLICEMIA : mg/dl/kg/dia

NÍVEIS SÉRICOS DE GLICOSE : mg/dl

NÍVEIS SÉRICOS DE INSULINA : µU/ml

RAZÃO INSULINA / GLICOSE :

NÍVEIS SÉRICOS DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES :

NÍVEIS SÉRICOS DE CORPOS CETÔNICOS :

CETONÚRIA : NÃO SIM

TESTE DO GLUCAGON : NEGATIVO POSITIVO NÃO REALIZADO

EXAME GENÉTICO : NÃO SIM

TRATAMENTO COM DIAZÓXIDO : NÃO SIM - POR QUANTO TEMPO :

RESPOSTA CLÍNICA AO DIAZÓXIDO : NÃO SIM

IDADE DA CIRURGIA :

EXTENSÃO DA 1ª PANCREATECTOMIA : 85% 90% 95% 98%

2ª PANCREATECTOMIA : NÃO SIM - 95% 98%

3ª PANCREATECTOMIA : NÃO SIM - 95% 98%

ALTA HOSPITALAR (DIA PÓS-OPERATÓRIO) :

EVOLUÇÃO NO PÓS-OPERATÓRIO : HIPOGLICEMIA DIABETES

Nº EXAME ANÁTOMO-PATOLÓGICO :

DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO : CHI DIFUSO CHI FOCAL

EXAME IMUNOHISTOQUÍMICO : NÃO SIM

SANGUE DO PACIENTE P/ EXTRAÇÃO DE DNA : NÃO SIM

SANGUE DA MÃE P/ EXTRAÇÃO DE DNA : NÃO SIM

EVOLUÇÃO A LONGO PRAZO (ATÉ 12 MESES DE IDADE) :

1) DIABETES : NÃO SIM - COM QUE IDADE :

2) RETARDO DO DNPM : NÃO SIM

3) ÓBITO : NÃO SIM – IDADE DO ÓBITO :

ANEXO D: Especificações dos reagentes utilizados nos procedimentos IHQ

Anti-corpo/ Clone	Marca	Título ***	Comparti- mento celular relevante	Recupe- ração antigênica (duração)	Bloqueadores de enzimas endógenas: peroxidase, avidina e biotina e fosfatase alcalina	pH	Sistema de amplificação	Revelação
Insulina Policlonal <i>guinea pig</i> A0564	Dako Denmark	1/200 a 1/1000	citoplasmático granular	Não	Bloqueio da peroxidase com H ₂ O ₂ (20 vol) 6 banhos de 5' cada	–	LSAB (<i>Dako</i>)	DAB 5' à 37 °C
Ki-67 Monoclo-nal Clone Ki-S5	Dako Denmark	1/50 a 1/2000	nuclear	Sim 3' em panela de pressão	Bloqueio da peroxidase com H ₂ O ₂ (20 vol) 6 banhos de 5' cada	6,0 tampão citrato	Novolink (<i>Novocastra</i>)	DAB 5' à 37 °C
SUR 1 Policlonal Cabra C- 16	Santa Cruz CA, USA	1/50 a 1/200	citoplasmático granular	Sim 10' em panela de pressão	Bloqueio da peroxidase com H ₂ O ₂ (20 vol) 6 banhos de 5' cada	9,0 tampão TRIS / EDTA	LSAB (<i>Dako</i>)	DAB 5' à 37 °C
Kir 6.2 Policlonal Cabra N- 18	Santa Cruz CA, USA	1/50 a 1/100	citoplasmático granular	Sim 7' em panela de pressão	Bloqueio da peroxidase com H ₂ O ₂ (20 vol) 6 banhos de 5' cada	9,0 tampão TRIS / EDTA	LSAB (<i>Dako</i>)	DAB 5' à 37 °C
Dupla marcação com Insulina e Ki-67 especifi- cados acima	<i>Dako</i> - Kit EnVision Double staining Rabbit/Mouse (DAB + Perma- nent Red)	Insulina: 1/100 a 1/300 Ki-67: 1/50 a 1/1000	citoplasmático granular (insu- lina) e nuclear (Ki-67)	Sim 3' em panela de pressão	Bloqueio da peroxidase com H ₂ O ₂ (20 vol) + bloqueio fosfatase alcalina (kit)	6,0 tampão citrato	Kit EnVision <i>Dako</i> (insulina) e Novolink <i>Novocastra</i> (Ki-67)	Permanent Red (insulina) e DAB (Ki-67) de acordo com a bula do kit

***Concentrações variáveis devido às diferenças da fixação em formalina das amostras de pâncreas nos últimos 20 anos.

ANEXO E**Protocolo de Imuno-histoquímica :**

- MONTAR A BATERIA DE CASOS COM OS RESPECTIVOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS
- DESPARAFINIZAÇÃO : xitol I A 60°C – 30 min.
xitol II T.A. – 10 min.
- BATERIAS DE ALCCOIS PARA HIDRATAR :
 - álcool absoluto I - 2 min.
 - álcool absoluto II - 2 min.
 - álcool 95% - 2 min.
 - álcool 95% - 2 min.
- LAVAR EM ÁGUA CORRENTE E DESTILADA.
- BLOQUEIO DE PEROXIDASE ENDÓGENA COM:
 - H₂O₂ 20 vol - 6 x 5 min. cada
- LAVAR EM ÁGUA CORRENTE E DESTILADA.
- PRÉ – TRATAMENTO :
- TRIPSINA (PINGAR DIRETO NOS CORTES) – 10 MIN. À 37°C OU
- PANELA DE PRESSÃO: 3 MIN. COM TAMPÃO CITRATO.
- LAVAR EM ÁGUA CORRENTE , DESTILADA.
- LAVAR COM TAMPÃO TRIS pH 7,4 - 3 TROCAS DE 2 MIN. CADA.
- INCUBAR COM O ANTICORPO PRIMÁRIO POR 18 HS À 4 °C.
- LAVAR COM TAMPÃO TRIS pH 7,4 – 3 TROCAS DE 2 MIN. CADA.
- INCUBAR COM O ANTICORPO SECUNDÁRIO POR 60 MIN. À 37 °C.
- LAVAR EM TRIS pH 7,4 - 3 TROCAS DE 2 MIN. CADA.
- INCUBAR COM O COMPLEXO POR 30 MIN À 37°C.
- LAVAR COM TRIS 7,4 – 3 TROCAS DE 2 MIN. CADA.
- REVELAR COM O SUBSTRATO DAB – 100 ML TRIS COM 60 MG DE DAB.
- FILTRAR E COLOCAR 1,5 ML DE H₂O₂ 20 VOL.
- INCUBAR POR 5 MIN. À 37°C.
- LAVAR EM ÁGUA CORRENTE E DESTILADA.
- CONTRACORAR COM HEMATOXILINA DE MAYER POR 1 MIN.
- LAVAR EM ÁGUA CORRENTE E DESTILADA.
- DESIDRATAR COM A BATERIA DE ÁLCOOL E XIOL.
- MONTAR COM ENTELLAN.

ANEXO F

Extração de DNA a partir de sangue periférico:

Para extração de DNA de sangue periférico utilizamos o protocolo de MILLER e colaboradores [1] com pequenas modificações, como segue adiante:

Quinze ml de sangue venoso foram colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se 2 volumes de sangue de solução de lise (NH_4Cl 114 mM, NH_4HCO_3 1 mM) com incubação a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Germany), sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelho foi repetido por mais uma vez.

O botão de células brancas foi suspenso em 9 ml de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 10 mM pH 8) com 180 µl de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 µl de proteinase K (10 mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), sendo o material incubado a 37°C por 18 horas. Após este período, 3,6 ml de solução saturada de cloreto de sódio (6 M) foi adicionada agitando-se o conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o DNA foi precipitado acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, em seguida lavado em etanol 70% durante 5

minutos repetindo-se a operação por mais 3 vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo seco por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após tal procedimento, o DNA foi ressuspensiondo em tampão TE 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 0,1 mM, pH 8).

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em um espectrofotômetro (Pharmacia LKB, Ultrospec III, England) no comprimento de onda de 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/ml). Foi estabelecido que a relação acima de 1,75 entre as leituras em 260 e 280 nm seria a ideal para a caracterização da pureza do material [2]. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 1% em TAE (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M, pH 8,0) contendo brometo de etídio (Sigma, St. Louis, MO, USA) na concentração de 0,5 µg/ml de gel e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade.

[1] MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, K.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nuc. Acid. Res., v. 16, p. 1215, 1988.

[2] SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Analysis and Cloning of Eukaryotic Genomic DNA in Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

ANEXO G

Extração de DNA a partir de tecido pancreático incluído em parafina:

A partir dos blocos de parafina foram obtidas secções equivalentes a 10 µm em microtubos de 1,5 ml. A estes tubos foi adicionado 1 ml de xilol pré-aquecido em estufa a 95°C. Os microtubos foram agitados e colocados em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 15000 x g e o sobrenadante descartado. Para eliminação eficaz da parafina os passos anteriores foram repetidos por mais 2 vezes. As amostras foram então submetidas a duas lavagens com 500 µl de etanol absoluto para a retirada do solvente orgânico. Após cada adição de etanol absoluto os microtubos foram centrifugados por 5 minutos a 13000 x g a 4°C e o sobrenadante descartado. As amostras foram secas invertendo os microtubos em papel absorvente. Para a extração do DNA, a cada microtubo foram adicionados 20 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 480 µl de solução constituída por 2,5 ml de Tris HCl 1M pH 8,0; 500 µl de EDTA 0,5M pH 8,0; 250 µl de Tween 20 e 46,75 ml de água deionizada. As amostras foram então incubadas por 18 horas a 37°C.

Foram realizadas duas extrações com 500 µl de fenol-clorofórmio. Os tubos foram invertidos cuidadosamente e centrifugados por 2 minutos a 13000 x g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e nova extração com fenol-clorofórmio foi realizada. Foram adicionados 40 µl de acetato de sódio 3M e 1 ml de etanol absoluto gelado misturando-se delicadamente. As amostras foram mantidas por 24 horas, a -20°C, para

precipitação do DNA. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 13000 x g a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os tubos foram invertidos sobre papel absorvente para secagem do material. Depois de seca, cada amostra foi ressuspensa em 50 µl de TE 10:0,1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0 ; EDTA 0,1mM pH 8,0) e estocadas a -20°C.

ANEXO H

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR):

Em um volume final de 50 µl foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 30 pmol de cada *primer*, 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase (Amersham, Pharmacia, Upsala, Suécia) e tampão de reação fornecido pelo fabricante. A amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo de amplificação consistiu de um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de *annealing* variando de acordo com o par de *primers* utilizado por 30 seg e 72°C por 30 seg, seguindo-se um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml de gel) (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando-se como marcador de peso molecular φX 174/Hae III (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA). As amostras foram visualizadas sob transiluminação em luz ultravioleta e fotografadas com filme instantâneo preto e branco (Polaroid 667).

ANEXO I**Localização dos primers na seqüência genômica para o gene KCNJ11
(Kir 6.2)**

TGAGTGCAGCCCCAGGGTGAGAAGGTGCCACCGAGAG **GACTCTGCA**
GTGAGGCCCTAGGCCACGTCCGAGGGGTGCCTCCGATGGGGGAAGCC
CCTCCCTGGGGTCACCGGAGCC

ATGCTGTCCCAGGGCATCATCCCCGAGGAATACGTGCTGACACGC
CTGGCAGAGGACCCTGCCAAGCCCAGGTACCGTGCCGCCAGCGGAG
GGCCCGCTTGTGTCCAAGAAAGGCAACTGCAACGTGCCACAAGAA
CATCCGGGAGCAGGGCCGCTCCTGCAGGACGTGTTACCAACGCTGGT
GGACCTCAAGTGGCCACACACATTGCTCATCTTCACCATGTCCCTCCTG
TGCAGCTGGCTGCTCTCGCCATGGCCTGGTGGCTCATGCCCTCGCC
CACGGTGACCTGGCCCCCAGCGAGGGCACTGCTGAGCCGTGTCAC
CAGCATCCACTCCTCTCGTCTGCCCTTCTCCATTGAGGTCCAAG
TGACTATTGGCTTGGGGCGCATGGTACTGAGGAGTGCCACTGG
CCATCCTGATCCTCATCGTGCAGAACATCGTGGGCTCATGATCAACGC
CATCATGCTTGGCTGCATCTCATGAAGACTGCCAAGCCCACCGCAG
GGCTGAGACCTCATCTTCAGCAAGCATGCGGTATGCCCTGCGCCA****
CGGCCGCCTCTGCTTCATGCTACGTGGTGGTACCTCCAGAGCAT
GATCATCAGCGCCACCATCCACATGCAGGTGGTACGCAAGACCACAG
CCCCGAGGGCGAGGTGGTGCACAGCATCTCCTGGTGGACATCCCCATGG
AGAACGGCGTGGGTGGCAACAGCATCTCCTGGTGGCCCCGCTGATCA
TCTACCATGTCATTGATGCCAACAGCCCACACTACGACCTGGCACCCAG
CGACCTGCACCACCAAGGACCTCGAGATCATCGTCATCCTGGAAAGG
CGTGGTGGAAACCACGGCATCACCAACCCAGGCCGACCTCCTACCT
GGCCGATGAGATCCTGTGGGCCAGCGCTTGTGCCATTGTAGCTGA
GGAGGACGGACGTTACTCTGTGGACTACTCCAAGTTGGCAACACCGT
CAAAGTGCCACACCACTCTGCACGGCCGCCAGCTTGATGAGGACCA
CAGCCTACTGGAAGCTCTGACCCCTGCCCTCAGCCCGGGCCCTGC
GCAAGCGCAGCGTGCCATGCCAAGGCCAAGCCCCAGTTCAGCATCT
CTCCAGATTCCCTGTCCCTGA

GCCATGGTCTCTGGGCCCCCACACCGGTGTACACACGGACCATG
TGGTATGTAGCCCAGGCCAGGGCCTGGTGTGAGGCTGGCCAGCCTCA
GCTCAGCCTCCCCCTGCTGCTCATCCAGGGTGTACAAGGCACTTGTCA
CTATGCTATTCTGGCCTCAGCAGGAA

Fragmento 1  Fragmento 2  Fragmento 3  Fragmento 4 

ANEXO J**Localização dos primers na seqüência genômica do gene ABCC8 (SUR 1)****EXON 33**

GTCTCCAAC TACCTCAACTGGATGGT GAGGAACCTGGCAGACATGGA
GCTCCAGCTGGGGCTGTGAAGCGCATCCATGGGCTCCTGAAAACCG
AGGCAGAGAGCTACGAGGGCTCCTGG
GTGAGAGGCTCAGGGAGAGGGTGGGGAAAGAGTCCAAGGAGGAGTGT
GTCTGGGTTGGGGGCCACAAGGGAGCCTGGGATGGGTGGCACTTT
CGGATACTAGCTGTGG**CCCATGCCTGGTGGCTGAG**CCCAGCCCAGGCC
CCCAG

EXON 34

CACCATCGCTGATCCCAAAGAACTGGCCAGACCAAGGAAAGATCCAG
ATCCAGAACCTGAGCGTGCGCTACGACAGCTCCCTGAAGCCGGTGCT
GAAGCACGTCAATGCCCTCATGCCCTGGACAGAAG
GTCAGAGCACGGGCCAACCAATGCTGCAGGACAGGCGTGAGCAGG
GGATGGGGCATGCACGGAGCTGGATGGCTTCGAGTCACCTCGTGGC
CCTCCAGGGCCGAGGCCTCTCACTATTAGACATCGCAGTCTCCTGCC
CTGGGCCTGTGGGGCCATCTTCCCTCCTCTATTGCCTCCCCCA
GTGCTGCCCTCAGGCCTTGTCTCACTCATCCACCAAGGAGACCGAC
ACTCTGGACTCCCCAGCTCACACGGGTTGTCAGGGCCTCCCTCTC
TGCAGATGGTCAGGGCTTCCCTAGGGCACTGCCCGAGCTCAGGG
CAGGGACCTGGGGCAGACAGCGAGGCCACCCCTGTATTGAGGGTGA
GCCCTGCCTATGCCCTGGCCAGCTCTCCTCGTTCCACTCTGT
CTCTTGTCTGTCTCACTTGCTGTGGCTGTCCATGTCATTCTCTGAC
CTTGGGATGTACCTCTGCCCTGCCTCTCATCCTCTATTGTCACATC
TGTCTCCGTATTGTAATTCTGTTGGTACCCAAGTGCCAGGAAGCAACG
GGATCAGAGGTGGCTCCATTGTAGGGCGGGCACACAGACACATCCAT

GCATACCACTCTCAGCTGCCCTGTGTCCTGCCACACCCATGCCA
TAGAGACACACCACTGCCCCCCAGCTCTCCTCAGCCAAGTACCCGGC
ACACCCAGACCCACACCAAGGCCAGGCAAATGGACATCCATGCCTGC
ACTTGCCTGCCGGTCCCTGTGTAAGCCCTCTGGACCCACTGCAGGA
AACAAAGCCAAACCTGTGGTGTCAAAGAGAAACTAGTCAGAAAACCAG
GCCAAAAAAGATAACCCTGTGACCTCCCACACCTGCACACACACCCAGAG
CTAGCATAGAGGCTATTCCCAGCAGCCCCAGAGTCCCAGTGGCGGTGC
CTGCTTCTCTTTCCAG

EXON 35

ATCGGGATCTGCGGCCGCACCGGCAGTGGAAAGTCCTCCTCTCTT
GCCTTCTTCCGCATGGTGGACACGTTCGAAG
GTGAGTTGTAAGGCAGGGCACCCCCACGTGTACCCACAGCCACCAGATGA
GGCCTCAGCCCTGGCACGTGGTCAGACATGACAGGAGGCCAGCAGT
CACCGCCTCCCTGCACCCCTCACTGGGACCCATGCAG

EXON 36

GGCACATCATCATTGATGGCATTGACATGCCAAACTGCCGCTGCACA
CCCTGCCTCACGCCTCTCCATCATCCTGCAGGACCCGTCCCTTTCA
CGGGCACCATCCG
GTGAGCCCCACCAACCCCTCAGGCCACCCAGCCCCAGGCCGGCTCAG
TTCCATCAGATCTGGAGCACAAGAGGAGGGGGTTGGGGAGACCAG
GATCCCAGAGGTGTTCTGCTCATGCCCTCTCCATCCCATCAGGCC
AGGCAGCCTCTGGAAGGGGATCCCCACCCATGGGTCTAAGATGCTGT
CCCCCACCCACTGCCACCCACCTCGGTGCTTCTCCAGCCAGACCTCCA
ACTCAGTCTGCTCTGCTCACTGCCCTTTGCCGCCTGGGATGCAG
GCAGGGACCCCTGCTCCCTCCACTGGGGTTCTGTGCCACTTCCAG

EXON 37

ATTTAACCTGGACCCTGAGAGGAAGTGCTCAGATAGCACACTGTGGG
AGGCCCTGGAAATGCCAGCTGAAGCTGGTGGTAAGGCACGTCCA
GGAGGCCTCG
GTAACACTCCTGGCTATGCAGCTGGTTGGTGGCACTCAAGGACC
CTGTAAGGATGGCAGACAGAAGCCCCTGTCTCAGGTTGCCCAAGTT
GGAGTCTGAAGCCTGGCAGGACCATTAGTCCTACTTCTCACTATAACGG
GGGCCAGAGAGGTCAAGGTCTTGCCCCAGGTACACAACTGGTCAG
TTCAGGGTCTGGCTCCTGCAGGGTACAGCGGGTACAGTCAGGGAT
CCTTGTGAGACAGAGATTGCGAGTCCCCATGCCAAGGGGCATCTTC
AGCCCTGCCCTGCCCATCCACCTGCATGCCAGTTCTGCCTTAGGGG
AGGAGAAGATGGACTGGCAATCATAGACACGGGTCACTCATCAAGGC
CACCGGTGATTGGCAAAGCCTGGTATTTGCTGCAGCTCCTGGAGCA
TTGGGGGTGGCCAAGCCTGGTTCAATGAATCACCTACCAAGGCCCT
ACATACACACTCAGTGCACCCCTCAGTGCACACGCCCTCCAGAACT
GCCCAAGGCCACAGCAGCACACACCTCCAGGGTGCCTCTCGTTGC
AGTCCTTGCAGACGGCCTCCACATTGTTGTTCAGGTGCACCAGCCCT
GCACACGCCCTGTGCTCTGGACACACACCCACCTATTGCCCTCATGCA
CACATTCCAACAGCCCCCAAGCCATCCCCTGCTCCACTCACAGC
ACAAGATTAACTCAGTCCTACTTCATCTCCCCGGCTGTTTCAG

Exon 33



Exon 34



Exon 35



Exon 36



Exon 37



9 REFERÊNCIAS

- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of beta-cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. 1995 Apr 21;268(5209):423-6.
- Aguilar-Bryan L, Bryan J. Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. *Endocr Rev*. 1999;20(2):101-35.
- Ashcroft FM. ATP-sensitive K⁺ channels and disease : from molecule to malady. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E880-E889.
- Bakker B, Oostdijk W. Diagnosis and management of congenital hyperinsulinism : a case report. *Eur J Endocrinol*. 2006; 155:S153-S155.
- Béringué F, Blondeau B, Castellotti MC, Bréant B, Czernichow P, Polak M. Endocrine Pancreas Development in Growth-Retarded Human Fetuses. *Diabetes*. 2002;51:385-91.
- Berrocal T, Luque A-A, Pinilla I, Lassaletta L. Pancreatic regeneration after near-total pancreatectomy in children with nesidioblastosis. *Pediatr Radiol*. 2005;35:1066-70.
- Biagiotti L, Proverbio MC, Bosio L, Gervasi F, Rovida E, Cerioni V, Bove M, Valin PS, Albarello L, Zamproni I, Grassi S, Doglioni C, Mora S, Chiumello G, Biunno I . Identification of two Novel Frameshift Mutations in the KCNJ11 gene in two Italian patients affected by Congenital Hyperinsulinism of Infancy. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(1):59-64.

Bouwens L, Lu WG, De Krijger R. Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia*. 1997;40:398-404.

Bouwens L, Pipeleers DG. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia*. 1998;41:629-33.

Bouwens L, Rooman I. Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiol Rev*. 2005;85:1255-270.

Bratanova-Tochkova TK, Chenq H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GW. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*. 2002 Feb;51(1):S83-90.

Bryan J, Vila-Carries WH, Zhao G, Babenko AP, Aguilar-Bryan L. Toward Linking Structure With Function in ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Diabetes*. 2004;53(S3):S104-S112.

Cartier EA, Conti LR, Vandenberg CA, Shyng SL. Defective trafficking and function of K-ATP channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;27:2882-87.

Chan KW, Zhang H, Logothetis DE. N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *EMBO J*. 2003;22(15):3833-43.

Christesen HBT, Brusgaard K, Alm J, Sjöblad S, Hussain K, Fenger C, Rasmussen L, Hovendal C, Otonkoski T, Jacobsen BB. Rapid Genetic Analysis in Congenital Hyperinsulinism. *Horm Res*. 2007;67:184-88.

Clement J-P, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. Association and Stoichiometry of K-ATP Channel Subunits. *Neuron*. 1997;18:827-38.

Damaj L, le Lorch M, Verkarre V et al. Chromosome 11p15 paternal isodisomy in focal forms of neonatal hyperinsulinism. *J Clin Endocrin Metab*. 2008 Dec;93(12):4941-7.

Darendeliler F, Fournet J-C, Bas F, Junien C, Gross M-S, Bundak R, Saka N, Günöz H. ABCC8 (SUR1) and KCNJ11 (KIR6.2) Mutations in Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy and Evaluation of Different Therapeutic Measures. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2002;15(7):993-1000.

De León DD, Stanley CA. Mechanisms of Disease : advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(1):57-68.

De Lonlay-Debeney P, Poggi-Travert F, Fournet J-C, Sempoux C, Vici CD, Brunelle F, Touati G, Rahier J, Junien C, Nihoul-Fékété C, Robert J-J, Saudubray J-M. Clinical features of 52 neonates with hyperinsulinism. *N Engl J Med*. 1999;340:1169-1175.

De Lonlay P, Fournet J-C, Touati G, Groos M-S, Martin D, Sevin C, Delagne V, Mayaud C, Chigot V, Sempoux C, Brusset M-C, Laborde K, Bellane-Chantelot C, Vassault A, Rahier J, Junien C, Brunelle F, Nihoul-Fékété C, Saudubray J-M, Robert J-J. Heterogeneity of persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia. A series of 175 cases. *Eur J Pediatr*. 2002;161:37-48.

De Lonlay P, Touati G, Robert J-J, Saudubray J-M. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia. *Semin Neonatol*. 2002;7:95-100.

- De Lonlay P, Cormier-Daire V, Amiel J, Touati G, Goldenberg A, Fournet J-Brunelle F, Nihoul-Fékété C, Rahier J, Junien C, Robert J-J, Saudubray J-M. Facial Appearance in Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia. *Am J Med Genet.* 2002;111:130-33.
- De Lonlay P, Giurgea I, Sempoux C, Touati G, Jaubert F, Rahier J, Ribeiro M, Brunelle F, Nihoul-Fékété C, Robert J-J, Saudubray J-M, Stanley C, Bellanné-Chantelot C. Dominantly inherited hyperinsulinaemic hypoglycemia. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28:267-76.
- De Lonlay P, Simon-Carre A, Ribeiro MJ, Boddaert N, Giurgea I, Laborde K, Bellanné-Chantelot C, Verkarre V, Polak M, Rahier J, Syrota A, Seidenwurm D, Nihoul-Fékété C, Robert J-J, Brunelle F, Jaubert F. Congenital Hyperinsulinism : Pancreatic [18F] Fluoro-L-Dihydroxyphenylalanine (DOPA) Positron Emission Tomography and Immunohistochemistry Study of DOPA Decarboxylase and Insulin Secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91: 933-40.
- De Lonlay P, Simon A, Galmiche-Rolland L, Giurgea I, Verkarre V, Aigrain Y, Santiago-Ribeiro MG, Polak M, Robert J-J, Bellanne-Chantelot C, Brunelle F, Nihoul-Fékété C, Jaubert F. Neonatal hyperinsulinism : clinicopathologic correlation. *Hum Pathol.* 2007;38:387-99.
- De Vroede M, Bax N, Brusgaard K, Dunne M, Groenendaal F. Laparoscopic Diagnosis and Cure of Hyperinsulinism in Two Cases of Focal Adenomatous Hyperplasia in Infancy. *Pediatrics.* 2004;114(4):e520-e522.
- Dekelbab BH, Sperling MA. Recent advances in hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Acta Paediatr.* 2006;95:1157-64.

- Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A, Lindley KJ. Hyperinsulinism in Infancy : From Basic Science to Clinical Disease. *Physiol Rev.* 2004;84:239-75.
- Dunne MJ. Ions, genes and insulin release : from basic science to clinical disease. *Diabet Med* 2000;17:91-104.
- Efrat S. Regulation of Insulin Secretion Insights from Engineered β -cell Lines. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:88-96.
- Faye-Peterson OM, Kapur RP. A Little Bit of Everything : Molecular Genetics of Congenital Hyperinsulinism. *Pediatr Dev Pathol.* 2002;6:3-5.
- Fernández-Marmiesse A, Salas A, Veja A, Fernández-Lorenzo JR, Barreiro J, Carracedo A. Mutation Spectra of ABCC8 Gene in Spanish Patients with Hyperinsulinism of Infancy. *Hum Mutat.* 2006 Feb;27(2):214-28.
- Fournet J-C, Junien C. Genetics of Congenital Hyperinsulinism. *Endocr Pathol.* 2004;15(3):233-39.
- Fournet J-C, Junien C. The genetics of neonatal hyperinsulinism. *Horm Res.* 2003;59(1):30-34.
- Fournet J-C, Mayaud C, DeLonlay P, Gross-Morand M-S, Verkarre V, Castanet M, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert J-J, Nihoul-Fékété C, Saudubray JM, Junien C. Unbalanced Expression of 11p15 Imprinted Genes in Focal Forms of Congenital Hyperinsulinism. *Am J Pathol.* 2001;158(6):2177-184.

Geng X, Li L, Watkins S, Robbins PD, Drain P. The Insulin Secretory Granule Is the Major Site of K-ATP Channels of the Endocrine Pancreas. *Diabetes*. 2003;52:767-76.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad H-D. Immunobiochemical and Molecular Biologic Characterization of the Cell Proliferation-associated Nuclear Antigen That Is Defined by Monoclonal Antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;138(4):867-73.

Gerdes J, Becker MHG, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol*. 1992;168:85-87.

Giurgea I, Ribeiro M-J, Boddaert N, Touati G, Robert J-J, Saudubray J-M, Jaubert F, Bellanné-Chantelot C, Brunelle F, Nihoul-Fékété C, de Lonlay P. L'hyperinsulinisme congénital du nouveau-né et du nourrisson. Congenital hyperinsulinism in newborn and infant. *Arch Pediatr*. 2005;12:1628-635.

Giurgea I, Bellanné-Chantelot C, Ribeiro M, Hubert L, Sempoux C, Robert J-J, Blankenstein O, Hussain K, Brunelle F, Nihoul-Fékété C, Rahier J, Jaubert F, DeLonlay P. Molecular Mechanisms of Neonatal Hyperinsulinism. *Horm Res*. 2006;66:289-96.

Giurgea I, Sanlaville D, Fournet J-C, Sempoux C, Bellanné-Chantelot C, Touati G, Hubert L, Groos M-S, Brunelle F, Rahier J, Henquin J-C, Dunne MJ, Jaubert F, Robert J-J, Nihoul-Fékété C, Vekemans M, Junien C, DeLonlay P. Congenital hyperinsulinism and mosaic abnormalities of the ploidy. *J Med Genet*. 2006;43:248-54.

Glaser B, Phillip M, Carmi R, Lieberman E, Landau H. Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy ("Nesidioblastosis") : Autosomal Recessive Inheritance in 7 Pedigrees. *Am J Med Genet.* 1990;37:511-15.

Glaser B, Chiu KC, Anker R, Nestorowicz A, Landau H, Ben-Bassat H, Shlomai Z, Kaiser N, Thornton PS, Stanley CA, Spielman RS, Gogolin-Ewens K, Cerasi E, Baker L, Rice I, Donis-Keller H, Permutt MA. Familial hyperinsulinism maps to chromosome 11p 14 -15.1, 30 cm centromeric to the insulin gene. *Nat Genet.* 1994;7:185-88.

Glaser B, Landau H, Permutt, MA. Neonatal Hyperinsulinism. *Trends Endocr Metab.* 1999;10:55-61.

Glaser B, Furth J, Stanley CA, Baker L, Thornton PS, Landau H, Permutt MA. Intronenic Single Nucleotide Polymorphism Haplotype Analysis of SUR1 mutations in Familial Hyperinsulinism. *Hum Mutat.* 1999;14:23 -29.

Glaser B, Thornton P, Otonkoski T, Junien C. Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000;82:F79-F86.

Gloyn AL, Siddiqui J, Ellard S. Mutations in the Genes Encoding the Pancreatic Beta-Cell K-ATP Channel Subunits Kir 6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in Diabetes Mellitus and Hyperinsulinism. *Hum Mutat.* 2006; 27(3):220-31.

Greer RM, Shah J, Jeske YW, Brown D, Walker RM, Cowley D, Bowling FG, Liaskou D, Harris M, Thomsett MJ, Choong C, Bell JR, Jack MM, Cotterill AM. Genotype-Phenotype Associations in Patients with Severe Hyperinsulinism of Infancy. *Pediatr Dev Pathol.* 2007; 10:25-34.

Grimberg A, Ferry RJ, Kelly A, Koo-McCOY S, Polonsky K, Glaser B, Permutt MA, Aguilar-Bryan L, Stafford D, Thornton PS, Baker L, Stanley CA. Dysregulation of Insulin Secretion in Children With Congenital Hyperinsulinism due to Sulfonylurea Receptor Mutations. *Diabetes*. 2001;50:322-28.

Guerrero-Fernández J, Casado I, Colindres L, Bouthelier R. Hiperinsulinismo congénito. Revisión de 22 casos. *An Pediatr (Barc)*. 2006; 65:22-31.

Hardy OT, Hohmeier HE, Becker TC, Manduchi E, Doliba NM, Gupta RK, White P, Stoeckert CI, Matschinsky FM, Newgard CB, Kaestner KH. Functional Genomics of the β -Cell: Short-Chain 3-Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase Regulates Insulin Secretion Independent of K^+ Currents. *Mol Endocrinol*. 2007;21(3):765-73.

Hardy OT, Pampaloni-Hernandez M, Saffer JR, Suchi M, Ruchelli E, Zhuang H, Ganguly A, Freifelder R, Adzick NS, Alavi A, Stanley CA. Diagnosis and Localization of Focal Congenital Hyperinsulinism by 18F-Fluorodopa PET Scan. *J Pediatr*. 2007;150:140-45.

Henquin J. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000 Nov;49(11):1751-60.

Henwood MJ, Kelly A, MacMullen C, Bhatia P, Ganguly A, Thornton PS, Stanley CA. Genotype-Phenotype Correlations in Children with Congenital Hyperinsulinism Due to Recessive Mutations of the Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Genes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(2):789-94.

Hoe FM, Thornton PS, Wanner LA, Steinkrauss L, Simmons RA, Stanley CA, Hussain K, Cosgrove KE. From congenital hyperinsulinism to diabetes mellitus: the role of pancreatic beta-cell K-ATP channels. *Pediatr Diabetes*. 2005;6:103-13.

Hoe FM, Thornton PS, Wanner LA, Steinkrauss L, Simmons RA, Stanley CA. Clinical features and insulin regulation in infants with a syndrome of prolonged neonatal hyperinsulinism. *J Pediatr*. 2006;148:207-12.

Huopio H, Shyng SL, Otonkoski T, Nichols CG. K-ATP channels and insulin secretion disorders. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 283:E207-E216.

Hussain K, Seppänen M, Näntö-Salonen K, Adzick NS, Stanley CA, Thornton P, Minn H. The Diagnosis of Ectopic Focal Hyperinsulinism of Infancy with [18F]-Dopa Positron Emission Tomography. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:2839-842.

Hussain K. Congenital hyperisulinism. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2005.

Inagaki N, Gono T, Clement JP 4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: a inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*. 1995 Nov; 270(5239):1166-70.

Jack MM, Walker RM, Thomsett MJ, Cotterill AM, Bell JR. Histologic Findings in Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy : Australian Experience. *Pediatr Dev Pathol*. 2000;3:532-47.

Jaffe R, Hashida Y, Yunis EJ. Pancreatic pathology in hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Lab Invest*. 1980;42:356-65.

Jamal AM, Lipsett M, Sladek R, Laganiere S, Hanley S, Rosenberg L. Morphogenetic plasticity of adult human pancreatic islets of Langerhans. *Cell Death Differ.* 2005;12:702-12.

Kaczirek K, Niederle B. Nesidioblastosis : An Old Term and a New Understanding. *World J Surg.* 2004;28:1227-30.

Kapoor RR, Gilbert C, Mohnike K, Blankenstein O, Fuechtner F, Hussain K. Congenital hyperinsulinism: [18F] DOPA PET/CT scan of a focal lesion in the head of the pancreas. *Fetal and Neonatal Edition – Images in Neonatal Medicine Arch Dis Child.* 2008;93:F166-F170.

Kassem S, Ariel J, Thornton PS, Scheimberg J, Glaser B. Beta-Cell Proliferation and Apoptosis in the Developing Normal Human Pancreas and in Hyperinsulinism of Infancy. *Diabetes.* 2000;49:1325-333.

Kassem SA, Ariel J, Thornton PS, Hussain K, Smith V, Lindley KJ, Aynsley-Green A, Glaser B. p57 KIP2 Expression in Normal Islet Cells and in Hyperinsulinism of Infancy. *Diabetes.* 2001;50:2763-769.

Lazarine DF, Pahl MMC, Damiani D, Dichtchekenian V, Setian N, Okay Y. Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy : case report. *J Pediatr (Rio J).* 2000;76(2):162-68.

Leibowitz G, Glaser B, Higazi AA, Salameh M, Cerasi E, Landau H. Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy (Nesidioblastosis) in Clinical Remission : High Incidence of Diabetes Mellitus and Persistent β-Cell Dysfunction at Long-Term Follow-Up. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(2):386-92.

Li M, Squire JA, Weksberg R. Molecular genetics of Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet.* 1998;79:253-59.

Lin Y-W, MacMullen C, Ganguly A, Stanley CA, Shyng S-L. A Novel KCNJ11 Mutation Associated with Congenital Hyperinsulinism Reduces the Intrinsic Open Probability of β -Cell ATP-sensitive Potassium Channels. *J Biol Chem.* 2006;281(5):3006-12.

Lüthge-Reinecke A, Koschoreck F, Kloppel G. The molecular basis of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and its pathologic substrates. *Virchows Arch.* 2000;436:1-5.

Marthinet E, Bloc A, Oka Y, Tanizawa Y, Wehrle-Haller B, Bancila V, Dubuis J-M, Philippe J, Schwitzgebel VM. Severe Congenital Hyperinsulinism Caused by a Mutation in the Kir 6.2 Subunit of the Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Impairing Trafficking and Function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:5401-406.

Matsuo M, Trapp S, Tanizawa Y, Kioka N, Amachi T, Oka Y, Ashcroft FM, Ueda K. Functional Analysis of Mutant Sulfonylurea Receptor, SUR1-R1420C, That Is Responsible for Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *J Biol Chem.* 2000;275(52):41184-191.

Mazor-Aronovitch K, Gillis D, Lobel B, Hirsch HJ, Pinhas-Hamiel O, Modan-Moses D, Glaser B, Landau H. Long-term neurodevelopmental outcome in conservatively treated congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol.* 2007; 157:491-97.

Meissner T, Beinbrech B, Mayatepek E. Congenital Hyperinsulinism : Molecular Basis of a Heterogeneous Disease. *Hum Mutat.* 1999;13:351-61.

Meissner T, Wendel U, Burgard P, Schaetzle S, Mayatepek E. Long-term follow-up of 114 patients with congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol.* 2003;149:43-51.

Meissner T, Rabl W, Mohnike K, Scholl S, Santer R, Mayatepek E. Hyperinsulinism in syndromal disorders. *Acta Paediatr.* 2001;90:856-59.

Melloul D. Transcription Factors in Islet Development and Physiology Role of PDX-1 in Beta-Cell Function. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:28-37.

Menni F, De Lonlay P, Sevin C, Touati G, Peigné C, Barbier Y, Nihoul-Fékété C, Saudubray JM, Robert J-J. Neurologic Outcomes of 90 Neonates and Infants With Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia. *Pediatrics.* 2001; 107(3):476-79.

Mikhailov MV, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MSP, Ford RC, Ashcroft FM. 3-D structural and functional characterization of the purified K-ATP channel complex Kir6.2 - SUR1. *EMBO J.* 2005;24:4166-175.

Miki T, Iwanaga T, Nagashima K, Ihara V, Seino S. Roles of ATP-Sensitive K⁺ Channels in Cell Survival and Differentiation in the Endocrine Pancreas. *Diabetes.* 2001;50(1):S48-S51.

Molven A, Rishaug U, Matre GE, Njolstad PR, Sovik O. Hunting for a Hypoglycemia Gene : Severe Neonatal Hypoglycemia in a Consanguineous Family. *Am J Med Genet.* 2002;113:40-46.

Muzyamba M, Farzaneh T, Behe P, Thomas A, Christesen HBT, Brusgaard K, Hussain K, Tinker A. Complex ABCC8 DNA variations in congenital hyperinsulinism: lessons from functional studies. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67:115-24.

Nachum Z, Ben-Shlomo I, Rakover Y, Weiner E, Shalev E. Early brain atrophy in persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *J Pediatr.* 2002;141(5):706-709.

Natarajan G, Aggarwal S, Merritt TA. A Novel Mutation Associated with Congenital Hyperinsulinism. *Am J Perinatol.* 2007 Aug;24(7):401-4.

Nestorowicz A, Wilson BA, Schoor KP, Inoue H, Glaser B, Landau H, Stanley CA, Thornton PS, Clement IV JP, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Permutt MA. Mutations in the sulfonylurea receptor gene are associated with familial hyperinsulinism in Ashkenazi Jews. *Hum Mol Genet.* 1996;5(11):1813-22.

Nestorowicz A, Inagaki N, Tohru G, Schoor KP, Wilson BA, Glaser B, Landau H, Stanley CA, Thornton PS, Seino S, Permutt MA. A Nonsense Mutation in the Inward Rectifier Potassium Channel Gene, Kir6.2, Is Associated With Familial Hyperinsulinism. *Diabetes.* 1997;46(11):1743-48.

Nielsen LB, Ploug KB, Swift P, Orskov C, Jansen-Olesen I, Chiarelli F, Holst J, Hougaard P, Porksen S, Holl R, De Beaufort C, Gammeltoft S, Rorsman P, Mortensen HB, Hanse L. Co-localisation of the Kir6.2 / SUR1 channel complex with glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression in human ileal cells and implications for glycaemic control in new onset type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:663-71.

Ohkubo K, Nagashima M, Naito Y, Taguchi T, Suita S, Okamoto N, Fuginaga H, Tsumura K, Kikuchi K, Ono J. Genotypes of the pancreatic β -cell K-ATP channel and clinical phenotypes of Japanese patients with persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia of infancy. *Clin Endocrinol.* 2005;62:458-65.

Otonkoski T, Ämmälä C, Huopio H, Cote GJ, Chapman J, Cosgrove K, Ashfield R, Huang E, Komulainen J, Ashcroft FM, Dunne MJ, Kere J, Thomas PM. A Point Mutation Inactivating the Sulfonylurea Receptor Causes the Severe Form of Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy in Finland. *Diabetes*. 1999;48:408-15.

Partridge CF, Beech DJ, Sivaprasadarao A. Identification and Pharmacological Correction of a Membrane Trafficking Defect Associated with a Mutation in the Sulfonylurea Receptor Causing Familial Hyperinsulinism. *J Biol Chem*. 2001;276(38):35947-952.

Peranteaou WH, Ganguly A, Steinmuller L, Thornton P, Johnson MP, Howell LJ, Stanley CA, Adzick NS. Prenatal Diagnosis and Postnatal Management of Diffuse Congenital Hyperinsulinism : A Case Report. *Fetal Diag Ther*. 2006;21:515-18.

Peranteaou WH, Bathaii SM, Pawel B, Hardy O, Alavi A, Stanley CA, Adzick NS. Multiple ectopic lesions of focal islet adenomatosis identified by positron emission tomography scan in an infant with congenital hyperinsulinism. *J Pediatr Surg*. 2007;42:188-92.

Petrik J, Pell JM, Arany E, McDonald TJ, Dean WL, Reik W, Hill DJ. Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia. *Endocrinol*. 1999 May;140(5):2353-63.

Polak M, Bouchareb-Banaei L, Scharfmann R, Czernichow P. Early Pattern of Differentiation in the Human Pancreas. *Diabetes*. 2000;49:225-232.

Rahier J, Sempoux C, Fournet JC, Poggis F, Brunelle F, Nihoul-Fékété C, Saudubray JM, Jaubert F. Partial or near-total pancreatectomy for persistent neonatal hyperinsulinaemic hypoglycemia : the pathologist's role. *Histopathology*. 1998;32:15-19.

Rahier J, Guiot Y, Sempoux C. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia of infancy : a heterogeneous syndrome unrelated to nesidioblastosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000;82:108-12.

Reimann F, Huopio H, Dabrowski M, Proks P, Gribble FM, Laakso M, Otonkoski T, Ashcroft FM. Characterisation of new K-ATP channel mutations associated with congenital hyperinsulinism in the Finnish population. *Diabetologia.* 2003;46:241-49.

Ribeiro MJ, Boddaert N, Bellanné-Chantelot C, Bourgeois S, Valayannopoulos V, Delzescaux T, Jaubert F, Nihoul-Fékété C, Brunelle F, DeLonlay P. The added value of [18F] fluoro - L – DOPA PET in the diagnosis of hyperinsulinism of infancy : a retrospective study involving 49 children. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007 Dec;34(12):2120-8.

Sempoux C, Guiot Y, Lefevre A, Nihoul-Fékété C, Jaubert F, Saudubray J-M, Rahier J. Neonatal Hyperinsulinemic Hypoglycemia : Heterogeneity of the Syndrome and Keys for Differential Diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1455-61.

Sempoux C, Guiot Y, Dubois D, Nolleaux M-C, Saudubray J-M, Nihoul-Fékété C, Rahier J. Pancreatic B-Cell Proliferation in Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy : An Immunohistochemical Study of 18 Cases. *Mod Pathol.* 1998;11(5):444-49.

Sempoux C, Guiot Y, Noël H, Jaubert F, Rahier J. Expérience du pathologue dans l'hypoglycémie hyperinsulinique néonatale persistante. *Ann Pathol.* 2002;22:375-86.

Sempoux C. Hyperinsulinisme Neonatal Persistant: les nouvelles découvertes em pathologie éclairent la pathophysiologie du syndrome et em dirigent l'approche thérapeutique. *Bull Mem Acad R Med Bel.* 2003; 158(5-6):291-97.

Sempoux C, Guiot Y, Dahan K, Moulin P, Stevens M, Lambot V, De Lonlay P, Fournet J-C, Junien C, Jaubert F, Nihoul-Fékété C, Saudubray J-M, Rahier J. The Focal Form of Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy - Morphological and Molecular Studies Show Structural and Functional Differences With Insulinoma. *Diabetes*. 2003;52:784-94.

Sempoux C, Guiot Y, Jaubert F, Rahier J. Focal and Diffuse Forms of Congenital Hyperinsulinism : The Keys for Differential Diagnosis. *Endocr Pathol*. 2004;15(3):241-246.

Shilyansky J, Fisher S, Cutz E, Perlman K, Filler RM. Is 95% Pancreatectomy the Procedure of Choice for Treatment of Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of the Neonate? *J Pediatr Surg*. 1997;32(2):342-46.

Shyng S-L, Ferrigni T, Shepard JB, Nestorowicz A, Glaser B, Permutt MA, Nichols CG. Functional Analysis of Novel Mutations in the Sulfonylurea Receptor 1 Associated With Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Diabetes*. 1998;47:1145-51.

Sivaprasadarao A, Taneja TK, Mankouri J, Smith AJ. Trafficking of ATP-sensitive potassium channels in health and disease. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(5):1055-1059.

Smith VV, Malone M, Risdon RA. Focal or Diffuse Lesions in Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy : Concerns about Interpretation of Intraoperative Frozen Sections. *Pediatr Dev Pathol*. 2001;4:138-43.

Smith AJ, Taneja TK, Mankouri J, Sivaprasadarao A. Molecular cell biology of K-ATP channels : implications for neonatal diabetes. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(21):1-17.

Stanley CA, Thornton PS, Ganguly A, MacMullen C, Underwood P, Bhatia P, Steinkrauss L, Wanner L, Kaye R, Ruchelli E, Suchi M, Adzick NS. Preoperative Evaluation of Infants with Focal or Diffuse Congenital Hyperinsulinism by Intravenous Acute Insulin Response Tests and Selective Pancreatic Arterial Calcium Stimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:288-96.

Steinkrauss L, Lipman TH, Hendell CD, Gerdes M, Thornton PS, Stanley CA. Effects of hypoglycemia on developmental outcome in children with congenital hyperinsulinism. *J Pediatr Nurs.* 2005 Apr;20(2):109-18.

Straub SG, Cosgrove KE, Ämmälä C, Shepherd RM, O'Brien RE, Barnes PD, Kuchinski N, Chapman JC, Schaeppi M, Glaser B, Lindley KJ, Sharp GWG, Aynsley-Green A, Dunne MJ. Hyperinsulinism of Infancy – The Regulated Release of Insulin by K-ATP Channel-Independent Pathways. *Diabetes.* 2001;50:329-39.

Subramaniam RM, Karantanis D, Peller PJ. [18F] Fluoro-L-DOPA PET / CT in Congenital Hyperinsulinism. *J Comput Assist Tomogr.* 2007;31(5):770-72.

Suchi M, MacMullen C, Thornton PS, Ganguly A, Stanley CA, Ruchelli ED. Histopathology of Congenital Hyperinsulinism : Retrospective Study with Genotype Correlations. *Pediatr Dev Pathol.* 2003;6: 322-33.

Suchi M, Thornton PS, Adzick NS, Macmullen C, Ganguly A, Stanley CA, Ruchelli ED. Congenital Hyperinsulinism Intraoperative Biopsy Interpretation Can Direct the Extent of Pancreatectomy. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:1326-335.

Suchi M, MacMullen CM, Thornton PS, Adzick NS, Ganguly A, Ruchelli ED, Stanley CA . Molecular and immunohistochemical analyses of the focal form of congenital hyperinsulinism. *Mod Pathol.* 2006;19:122-29.

Suchi M, Ernst LM, Stanley CA, Adzick NS, MacMullen C, Ruchelli ED. Localized Islet Cell Nuclear Enlargement In Congenital Hyperinsulinism : A Distinct Clinicopathologic Entity. *Mod Pathol.* 2007;20(2):287 (abstracts).

Sund NJ, Vatamaniuk MZ, Casey M, Ang S-L, Magnuson MA, Stoffers DA, Matschinsky FM, Kaestner KH. Tissue-specific deletion of *Foxa2* in pancreatic β cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes Dev.* 2001;15:1706-715.

Sundin A, Eriksson B, Bergstrom M, Langstrom B, Oberg K, Orlefors H. PET in the diagnosis of neuroendocrine tumors. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:246-57.

Taguchi T, Suita S, Ohkubo K, Ono J. Mutations in the Sulfonylurea Receptor Gene in Relation to the Long-Term Outcome of Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *J Pediatr Surg.* 2007;37(4):593-8.

Tanizawa Y, Matsuda K, Matsuo M, Ohta Y, Ochi N, Adachi M, Koga M, Mizuno S, Kajita M, Tanaka Y, Tachibana K, Inoue H, Furukawa S, Amachi T, Ueda K, Oka Y. Genetic Analysis of Japanese Patients With Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy - Nucleotide-Binding Fold-2 Mutation Impairs Cooperative Binding of Adenine Nucleotides to Sulfonylurea Receptor 1. *Diabetes.* 2000;49:114-120.

Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J. Mutations in the Sulfonylurea Receptor Gene in Familial Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Science.* 1995;268:426-29.

Thomas PM, Cote GJ, Hallman DM, Mathew PM. Homozygosity Mapping, to Chromosome 11p, of the Gene for Familial Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Am J Hum Genet.* 1995;56:416-21.

Thomas PM, Wohllk N, Huang E, Kuhnle U, Rabl W, Gagel RF, Cote GJ. Inactivation of the First Nucleotide-Binding Fold of the Sulffonylurea Receptor, and Familial Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Am J Hum Genet.* 1996;59:510-18.

Thomas PM, Ye Y, Lightner E. Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet.* 1996;5(11):1809-12.

Thornton PS, MacMullen C, Ganguly A, Ruchelli E, Steinkrauss L, Crane A, Aguilar-Bryan L, Stanley CA. Clinical and Molecular Characterization of a Dominant Form of Congenital Hyperinsulinism Caused by a Mutation in the High-Affinity Sulffonylurea Receptor. *Diabetes.* 2003;52:2403-10.

Tornovsky S, Crane A, Cosgrove KE, Hussain K, Lavie J, Heyman M, Nesher Y, Kuchinski N, Ben-Shushan E, Shatz O, Nahari E, Potikha T, Zangen D, Tenenbaum-Rakover Y, De Vries L, Argente J, Gracia R, Landau H, Eliakim A, Lindley K, Dunne MJ, Aguilar-Bryan L, Glaser B. Hyperinsulinism of Infancy : Novel ABCC8 and KCNJ11 Mutations and Evidence for Additional Locus Heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:6224-34.

Tyrrell VJ, Ambler GR, Yeow WH, Cowell CT, Silink M. Ten year's experience of persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia of infancy. *J Paediatr Child Health.* 2001;37:483-88.

Verkarre V, Fournet J-C, DeLonlay P, Gross-Morand M-S, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert J-J, Nihoul-Fékété C, Saudubray JM. Paternal mutation of the sulffonylurea Receptor (*SUR1*) Gene and Maternal Loss of 11p15 Imprinted Genes Lead to Persistent Hyperinsulinism in Focal Adenomatous Hyperplasia. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1286-291.

- Von Dorsche HH, Fält K, Titlbach M, Reiher H, Hahn H-J, Falkmer S. Immunohistochemical, morphometric, and ultrastructural investigations of the early development of insulin, somatostatin, glucagon, and PP cells in fetal human pancreas. *Diabetes Res.* 1989;12:51-56.
- Wang H, Gauthier BR, Hagenfeldt-Johansson KA, Iezzi M, Wollheim CB. *Foxa2 (HNF3 β) Controls Multiple Genes Implicated in Metabolism-Secretion Coupling of Glucose-induced Insulin Release.* *J Biol Chem.* 2002; 277(20):17564-570.
- Witte DP, Greider MH, Deschryver-Kecskemeti K, Kissane JM, White NH. The Juvenile Human Endocrine Pancreas: Normal versus Idiopathic Hyperinsulinemic Hypoglycemia. *Semin Diagn Pathol.* 1984; 1(1):30-42.
- Yan F-F, Lin Y-W, Macmullen C, Ganguly A, Stanley CA, Shyng S-L. Congenital Hyperinsulinism – Associated ABCC8 Mutations That Cause Defective Trafficking of ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Diabetes.* 2007;56: 2339-348.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane K-ATP Channels. *Neuron.* 1999;22(3):537-48.
- Zerbini MC, Almeida W, Wakamatsu A, Marujo W, Lopes LH, Maksoud JG. DNA content and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in persistent neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia. *Mod Pathol.* 1994;7(1):149-52.

Apêndice

Mensagens :: Mensagens: 08-12-0578 Receipt of New Paper by Pediatric and Develo... Page 1 of 1

Data: Tue, 30 Dec 2008 20:15:24 UT [30-12-08 18:15 18:15:24 EST]

De: peddev.path@chp.edu

Para: czerbini@usp.br

Cc: slovisolo@hu.usp.br, beremen@usp.br, emiliap@plugnet.com.br, thaisdm@icr.hcnet.usp.br, pepino@usp.br, czerbini@usp.br

Assunto: 08-12-0578 Receipt of New Paper by Pediatric and Developmental Pathology

Dear Prof. Zerbini,

On December 30, 2008, your manuscript entitled "CONGENITAL HYPERINSULINISM IN BRAZILIAN NEONATES: A STUDY OF HISTOLOGY, PROLIFERATION OF β -CELLS AND K ATP CHANNEL GENES" by Silvana Lovisolo, Berenice Mendonça, Emilia Modolo, Thais Della Manna, Paulo Hilário Saldiva, and Maria Claudia Zerbini was successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Pediatric and Developmental Pathology.

Your manuscript ID is: 08-12-0578.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<http://pdp.allentrack.net/cgi-bin/main.plex?el=A7Bx6UV3A6BNR4F2A9DMsxAnBUc4U5tBxWM9ZBLwZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office with questions.

Thank you for submitting your work to the Pediatric and Developmental Pathology.

Sincerely,

Miguel Reyes-Múgica, M.D.
Editor in Chief
Pediatric and Developmental Pathology

**CONGENITAL HYPERINSULINISM IN BRAZILIAN NEONATES:
A STUDY OF HISTOLOGY, PROLIFERATION OF β -CELLS AND K^{ATP}
CHANNEL GENES.**

**Silvana M. Lovisolo^{1,2} Berenice B. Mendonça⁴ Emilia M. Pinto¹ Thais Della
Manna³ Paulo Hilário N. Saldiva¹ Maria Cláudia N. Zerbini^{1,2}**

¹ Department of Pathology, University of São Paulo Medical School

² Anatomic Pathology Unity, University Hospital, University of São Paulo

³ Endocrinology Unity of Children Institute, Clinical Hospital, University of São Paulo
Medical School

⁴ Endocrinology Unity of Clinical Hospital, University of São Paulo Medical School

Address for correspondence:

Maria Claudia N. Zerbini, M.D., Ph.D.

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo 455

São Paulo , 01246-903

SP – Brasil

Czerbini@usp.br

Phone: 55 11 3061 7415 / 55 11 9622 5879

FAX: 55 11 3064 2744

Abstract

Congenital hyperinsulinism (CHI) is a rare pancreatic endocrine cell disease, and pancreatic histology remains questionable to explain its dramatic clinical features. The most severe cases of CHI, which are unresponsive to diazoxide, are found to be associated with genetic defects in the β -cell K^{ATP} channels in at least in half of the patients. The aim of this study was to examine pancreatic histology, β -cell proliferation (IHC Ki-67 / insulin) and β -cell K^{ATP} channels gene mutations in blood samples from eleven Brazilian patients who were diagnosed with non responsive CHI and who underwent a pancreatectomy. Pancreatic histology and β -cell proliferation in CHI patients were compared to pancreatic samples from 19 patients without CHI. Ten of the CHI cases were classified as diffuse, and one, as focal form. Nucleomegaly and β -cells with abundant cytoplasm were absent in controls and were observed only in patients with the diffuse form of CHI. Ki-67-LI was used to differentiate the adenomatous areas of the focal form CHI neonate from “loose clusters of islets” found in two diffuse form samples and one control sample. Ki-67-LI was higher in the focal CHI adenomatous areas, but diffuse CHI patients also had statistically higher Ki-67-LI than controls. This is the first genetic study of CHI patients in Brazil, and no mutations or new polymorphisms were found in the *ABCC8* gene (SUR1, exons 33-37) or in the single exon of the *KCNJ11* gene (Kir 6.2) in 4/4 patients evaluated. On the other hand, enhanced β -cell proliferation seems to be a constant feature in CHI patients, both in diffuse and focal forms.

Keywords: congenital hyperinsulinism, K^{ATP} channel mutations, Kir 6.2, Ki-67 / insulin double immunostaining, pancreatic β -cells proliferation index, SUR 1.

Abbreviations used in this paper: CHI, congenital hyperinsulinism; K^{ATP} channel, adenosine triphosphate-sensitive potassium channel; SUR1, sulfonylurea receptor 1 channel subunit; Kir 6.2, potassium inward rectifying 6.2 channel subunit; IGF-2, insulin growth factor 2; LOH, loss of heterozygosity; H&E, hematoxylin and eosin; Ki-67-LI, Ki-67 Labeling Index; IHC, immunohistochemical.

Introduction

Congenital hyperinsulinism (CHI) is a life-threatening disorder of glucose metabolism that occurs in neonates and infants. CHI is characterized by an inappropriate, continuous serum insulin level that does not respond to changes in blood glucose concentrations. These consistently elevated serum insulin levels are associated with hypo-fattyacidemia, hypo-ketonemia, a positive response to the glucagon test, and persistent hypoglycemia associated with a high mortality and morbidity (seizures, permanent brain damage and developmental delay) if not recognized early in life. The incidence of CHI ranges from 1:50000 live births in sporadic cases in to 1:2500 in consanguineous families [1]. There are many causes of neonatal hypoglycemia, and, although rare, CHI is the most common cause of persistent severe hypoglycemia in neonates [1,2]. Correct diagnosis is imperative, and the goal of treatment of these patients is to prevent brain damage from hypoglycemia by maintaining plasma glucose at normal levels through pharmacologic or surgical therapy [2].

To regulate insulin secretion, pancreatic β -cells possess a signal transduction system that links intracellular metabolic changes in the β -cell to ATP sensitive

potassium channels (K^{ATP}) in the cell membrane surface. Under normal physiological conditions, the K^{ATP} channels maintain the electrical potential of the β -cell membrane. Following both the uptake and the metabolism of glucose into β -cells, the ATP/ADP ratio increases, and the K^{ATP} channels close. This channel closure causes depolarization of the cell membrane, which opens voltage-gated calcium channels that regulate the entry of calcium into the β -cell. The subsequent rise in intracellular calcium concentration triggers the exocytosis of insulin granules [3].

The genetic pathogenesis of CHI can be classified into two groups: 1) K^{ATP} channel-dependent CHI, which is treated by partial or near-total pancreatectomy, and 2) CHI that is caused by various metabolic abnormalities and that responds to diazoxide. The most common form of CHI is classically associated with loss-of-function mutations in the β -cell membrane surface ATP-sensitive potassium channels. Each K^{ATP} channel is organized as an octameric complex of four SUR1 (sulfonylurea receptor 1) subunits and four Kir 6.2 (potassium inward rectifying 6.2) subunits. These subunits of the K^{ATP} channels are coded by two adjacent genes on the short arm of chromosome 11 (locus 11p15): the *ABCC8* gene that encodes SUR1 and the *KCNJ11* gene that encodes a rectifying ion pore, Kir 6.2 [4-9]. Mutations in the *ABCC8* and *KCNJ11* genes are inherited in an autosomal recessive manner in the majority of severe CHI cases occurring at birth, and these mutations impair the function of the K^{ATP} channels by affecting channel density, channel expression, channel trafficking from the endoplasmic reticulum, channel gating properties, and channel activity in response to changes in the concentrations of intracellular ATP and ADP. Functional studies on K^{ATP} channels isolated from CHI patients with *ABCC8* or *KCNJ11* mutations have demonstrated that the loss of operational channels results

in depolarized β -cells with unregulated calcium channel activity and inappropriate insulin secretion [10-12]. Most mutations result in inactive K^{ATP} channels that are unresponsive to diazoxide treatment, which opens potassium channels, inhibiting insulin secretion. Thus, the mutated potassium channels are always closed, stimulating constant insulin secretion from β -cells. Neonates with this form of mutation must be surgically treated.

Pathological examination of these pancreases reveals two basic types of histological β -cell changes associated with K^{ATP} -CHI: focal changes (25-50% of the cases) and diffuse changes (50-75% of the cases) [13-18].

The **focal form** of CHI consists of focal adenomatous hyperplasia of β -cells within a limited region of the pancreas, with the accumulation of islet cell clusters occupying more than 40% of the lobule [19]. It is caused by a non-Mendelian mode of inheritance which involves: 1) loss of heterozygosity (LOH) with somatic deletion of the maternal allele of the imprinted chromosome region 11p15 in the β -cells of the adenomatous area, but not in normal pancreatic areas [20], and 2) a germline mutation of SUR1 or Kir6.2 subunit genes in the paternal allele [20-22]. Thus, the acquired event results in expression of the mutated paternal allele with functional loss of the K^{ATP} channels. Because K^{ATP} channel mutations have been identified in only 60-70% of the focal form CHI patients, a recent study [23] questioned whether all cases of focal CHI have the same pathogenesis. This study demonstrated that focal islet cell adenomatous proliferation is caused by loss of maternally imprinted genes, even in patients with no identifiable mutations. Another recent study [24] demonstrated that some patients with the focal form who lose the maternal allele also have a duplication of the paternal allele on chromosome 11. This isodisomy renders

the β -cell homozygous for the *ABCC8* gene mutation, causing a K^{ATP} channel defect in the focal lesion similar to that observed in the diffuse form of CHI.

The **diffuse form** of CHI is characterized by cell hyper function of β -cells throughout the entire pancreas, and it is represented by distinct nuclear enlargement, up to three times the diameter of the adjacent endocrine cell nuclei [19,27], often resulting in giant and hyperchromatic nuclei, which are found to be polyploid by image analysis [28]; other findings include irregularly sized and poorly defined smaller endocrine cell clusters scattered in the acinar parenchyma or intimately connected with small or large ducts with budding-off of β -cells from duct epithelium (ductulo-insular complexes) [29]. Autosomal recessive mutations of the K^{ATP} channel genes *ABCC8* and *KCNJ11*, which code for the subunits SUR 1 and Kir 6.2, respectively, are found in approximately 50% of patients without a family history of CHI [5,31,32,34]. Mutations in *ABCC8* (SUR 1), which are more common than in *KCNJ11* (Kir 6.2), are distributed throughout the entire molecule, which has 39 exons, but are located predominantly within the region of exons 33-39 that codes for the NBF-2 (Nucleotide Binding Fold 2), one of the two ATP molecule binding site regions of the protein SUR 1 [3,31,34], which is crucial for channel function.

β -cell proliferation in the diffuse form is controversial. One study [16] found no significant difference of Ki-67-LI between patients with diffuse CHI and age-matched controls. Otherwise, Kassem et al. [26], who studied CHI patients grouped according to age (≤ 3 months and > 3 months), found that β -cell Ki-67-LI from diffuse CHI neonates was significantly greater than in the age-matched controls in both age groups, although proliferation was more intense in the younger group. Differential diagnosis between diffuse and focal forms of CHI is very important for

practical purposes because, in the diffuse disease, a near-total pancreatectomy is indicated, and in the focal disease, only partial pancreatectomy, limited to the lesion, should be performed, avoiding iatrogenic diabetes caused by an extensive surgery [22,29].

The aim of this study was to examine Brazilian neonates with CHI, regarding pancreatic histology, proliferation of β -cells, and K^{ATP} channel genes mutations.

Methods

Subjects:

This study was approved by the Ethics Committee of Clinical Hospital, University of São Paulo Medical School, and written informed consent was obtained from all patients and their mothers submitted to blood genetic exams.

Archival pancreatic paraffin tissue samples from 11 neonates with CHI, who underwent partial or near-total pancreatectomy during a 20 year period (1987-2007), were obtained from the Division of Anatomic Pathology, Clinical Hospital, University of São Paulo Medical School. From these patients, peripheral blood samples were obtained from four cases. In all children, the clinical diagnosis of CHI was made according to accepted criteria [1,2,3]. A detailed description of clinical data is present in TABLE 1. In summary, a total of 7 female and 4 male patients were included in the study, their age at the time of initial surgery ranged from 26 days to 13 months. Consanguinity of the parents was present in 5 cases (45.4%), 2 were twins, 3 were born prematurely, and 3 were macrosomic (> 4000 grams). For

histological parameters and % Ki-67-LI analysis, patients were divided into two age groups (\leq 3 months and $>$ 3 months) according to data pointing to this cut off as representative of changes in maturation of the endocrine pancreas [14-16,22,26,33].

Controls: For comparison of histology and Ki-67-LI of β -cells, a total of 19 control pancreatic samples were included in the study. These were obtained from autopsies of 10 females and 9 males ranging in age from 1 day to 12 months. All infants died of diseases not related to the pancreas and there was no history of maternal diabetes.

Light Microscopy: Surgical specimens from CHI patients and autopsy specimens from controls were fixed in 10% formalin and processed by the standard protocols for morphologic analysis. H&E sections and insulin immunostained slides of each case of the diffuse form were reviewed by two pathologists (SML and MCZ) regarding maturation features (ductulo-insular complexes defined as budding-off of β -cells, isolated or in clusters, from the exocrine duct epithelium, septal islets, centro-acinar small β -cell clusters, and spreading isolated β -cells) and functional features (nucleomegaly, defined as $>$ 3 times the adjacent endocrine nuclei, and β -cells with abundant cytoplasm). The intensity of each parameter was visually estimated as mild (+), moderate (++) and marked (+++). The focal form of CHI was defined as area(s) of focal adenomatous hyperplasia of β -cells ($>$ 40% of the lobule) [19,27].

Immunohistochemistry

Insulin and Ki-67 double immunohistochemistry: For double immunostaining with insulin (polyclonal, 1:300, Dako, Carpinteria, CA) and Ki-67 (KiS5, 1:1000, Dako, Carpinteria, CA) the kit EnVision^T G\2 Double Stain System (K5361, Dako,

Carpinteria, CA) was used, according to the manufacturer's protocol, except by using NOVOLINK™ (Novocastra, Newcastle upon Tyne, England) as amplification system for Ki-67.

Quantification: Ki-67 positive nuclei in 1000 insulin positive cells were counted in both, cases and controls, under high magnification (400 X) in random successive fields using the software Image Pro-Plus 4.1 for Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), a microcomputer IBM connected to a digital camera (JVC TK-C1380 Color Video Camera, Victor Company of Japan Limited, Japan) and an optical microscope (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Germany). The Ki-67-LI (number of Ki-67-labeled β-cell nuclei / 1000 β-cells) was determined and expressed as a percentage.

Statistical Analysis: For comparison of Ki-67-LI between patients and controls, a generalized linear statistical model was used, where Ki-67-LI was considered to be the dependent variable, and age (≤ 3 months vs. > 3 months) and the disease status (CHI patients vs. controls) were the predictive variables. The analysis was performed using SPSS v.13.0® software. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

Molecular-Genetic Methods

K+/ATP Mutation Analysis: Genomic DNA of 4 patients was extracted from peripheral blood using the *salting out* method [30]. Mutational screening was performed for exons 33 to 37 of the *ABCC8* gene (SUR-1 SULFONYLUREA RECEPTOR - ENST00000302539) and for the single exon of the *KCNJ11* gene (ATP-SENSITIVE INWARD RECTIFIER POTASSIUM CHANNEL 11 -

ENSG00000187486) throughout PCR amplification. Primer description and annealing temperature used for PCR are presented in TABLES 2-3. The amplification products were directly sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI PRISM 3100 Automatic Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Results

Histology

Results of the analysis of histological parameters, based on H&E and insulin immunostaining are presented in TABLE 4 (CHI patients) and TABLES 5-6 (controls) and are illustrated in FIGS. 1 A-E.

In diffuse CHI, the following histological findings were present in more than 50% of the cases: ductulo-insular complexes (63.6%) and nucleomegaly (54.5%). The other histological parameters were present in less than half of patients with great variability (9.0% to 36.3%). Functional criteria (nucleomegaly and enlarged insulin cytoplasm) were not observed in any of the control patients and were present in 54.5 % and 27.2 % of CHI patients, respectively. Maturation features, specially “septal islets” and “spreading isolated β -cells,” were present mainly in control neonates ≤ 3 months of age. Otherwise, in CHI patients, although not so frequent, these features were somehow marked in patients older than 3 months. In the focal CHI patient, three adenomatous areas of β -cells were observed in the head of the pancreas (FIGS. 2 A-B). Furthermore, in two diffuse CHI patients (FIGS. 2 C-D) and in one control neonate, (FIG. 2 E) areas of “loose cluster of islets” were observed, and these were

histologically very similar to the adenomatous areas of the focal CHI patients, but more loosely arranged.

Proliferation of β- cells

Double immunostaining for insulin and Ki-67 is illustrated in FIG. 1F, and results of Ki-67-LI are presented in TABLE 7 and in FIGS. 1 F and 2 B. The adenomatous area of the focal form presented a very high % Ki-67-LI (10.15%) as compared to controls (mean = 1.87 % ± 0.44) (FIG. 2 B). The uninvolved regions of the pancreas of the focal CHI patients presented a proliferation index similar to the control group. On the other hand, the “loose cluster of islets” observed in the diffuse CHI patients #3 and #4 (FIGS. 2 B-C) and in control #17 (FIG. 2 A) presented a low % Ki-67-LI (2.29 % in case 3, 2.43 % in case 4, and 1.54 % in control 17). These results point to the utility of β-cell Ki-67-LI to differentiate focal adenomatous hyperplasia from “loose cluster of islets” in the diffuse form of CHI, which can be misinterpreted by histology and insulin immunostaining alone.

In diffuse CHI patients, β-cell proliferation was greater than in the control group ($P = 0.009$) (TABLE 7). However, our results were not different in the two age groups (≤ 3 and > 3 months). No correlation between proliferative rate and age was observed, either in patients or in controls ($P = 0.796$).

K+/ATP channels:

Molecular analysis

No mutations or new polymorphisms were found in exons 33-37 of the *ABCC8* (SUR1) gene or at the single exon of *KCNJ11* (Kir 6.2) gene in the analysis of

genomic DNA from peripheral blood of 4 patients, 3 with the diffuse form and 1 with the focal form of CHI. However, four polymorphisms have already been described in this region of the *SUR1* gene (exons 33-37) and 14 polymorphisms in the whole *Kir6.2* gene (www.ensembl.org). Brazilian children have the same polymorphisms previously identified (Tables 8-9). Genetic analysis of the remaining seven patients and of the microdissected adenomatous area of the focal CHI pancreas, which had only paraffin-embedded samples for the DNA extraction, were considered not adequate for testing.

Discussion

It is now clear that CHI is a heterogeneous pancreatic endocrine cell disorder for which a diagnosis is made based on clinical, laboratorial, molecular-genetic findings, and histopathological parameters. Because of the completely different extents of surgical excision (near-total for diffuse form and only partial and localized for the focal form) and the consequent prognostic implications for cure (persistent hypoglycemia versus frank diabetes mellitus), the ability to distinguish the focal form from the diffuse form is of critical importance. In Brazil, the genetic screening and the [¹⁸F]-L-dopa positron emission tomography are not yet available for diagnostic purposes, so intraoperative distinction between the two forms may guide the extent of needed pancreatectomy.

Our morphologic findings confirm earlier reports that *nucleomegaly* is the most specific marker of the diffuse form of CHI [19,27]. We found that nucleomegaly is present in half of the diffuse cases, but in none of the controls. This finding was

determined by DNA polyploidization [28] and has been associated with β -cell hyperfunction. It is not known whether this is a primary or secondary event in the pathogenesis of hyperinsulinism in the CHI. All other histological parameters were found in both, patients and controls, indicating that they more likely represent the process of maturation of the pancreatic endocrine system, which involves the differentiation of β -cells from epithelial ductal cells and migration of these newly formed β -cells to the centro-acinar region, as previously stated [33]. In the past, infants with CHI were believed to have abnormal pancreatic development associated with the persistence of packets of islet cells budding off the epithelial ducts (ductulo-insular complexes, also known as *nesidioblastosis*), but immunohistochemical investigations have shown that it is a common pancreatic feature of normoglycemic neonates and infants and that nesidioblastosis, by itself, cannot be considered the underlying histologic basis of CHI [14, 15]. However, in our study, while the presence of *septal islets* and *spreading isolated β -cells* (representing this migration phenomenon) was more frequently observed in controls in the first 3 months of age, both parameters occurred with a high frequency in diffuse CHI patients older than 3 months of age, reflecting a true retardation in the maturation of β -cells, at least in a subgroup of these patients.

Two previous studies evaluated β -cell proliferation using insulin and Ki-67 double staining [16, 26], but only one of these studies reported a significantly higher β -cell proliferation in the diffuse form of CHI [26]. In our study, increased β -cell proliferation was observed in patients with either focal or diffuse forms of CHI when compared to normal controls ($P < 0.05$). These results confirm the findings of Kassem et al. [26]. No differences in β -cell proliferation were observed between

the two age groups (≤ 3 and > 3 months). In our patient with focal disease, the proportion of proliferating β -cells within the adenomatous area was disproportionately higher (10.15%) than in the adjacent pancreas (1.59%), where the proliferation index was similar to the control group. This finding could be an important tool to distinguish focal adenomatosis from the *loose cluster of islets*, identified in two diffuse CHI patients and in one control sample; in the *loose cluster of islets*, β -cells Ki-67-LI was much lower, similar to levels found in the diffuse areas of CHI.

In the focal form of CHI, the somatic deletion of the 11p15 maternal allele, which may be associated with the duplication of the 11p15 paternal allele [20, 21, 24, 25], is consistent with a proliferative monoclonal lesion caused by the imbalance of expression of imprinted genes located at 11p15, including *H19*, *p57^{kip2}* (*CDKN1C*), and *IGF-2* (Insulin Growth Factor 2), whose products are involved in the regulation of cell proliferation [23,25]. *p57^{kip2}* and *H19* are tumor suppressor genes that lead to cell cycle arrest. They are expressed on the maternal allele, whereas *IGF-2*, a growth factor gene, is expressed on the paternal allele [15,16]. This genetic event can explain, at least in part, our observation that proliferation rate of β -cells, is increased in the focal adenomatous area when compared with β -cells of normal age-matched controls. In the diffuse form, an increase of proliferation was less pronounced, but still statistically higher than controls. The mechanism underlying β -cell proliferation in the diffuse CHI is not well understood, as it is in the focal CHI.

In the last decade, great advances in the understanding of the genetic and molecular pathogenesis of CHI have been achieved, especially in regard to the K^{ATP} channel genes *ABCC8* (SUR 1) and *KCNJ11* (Kir 6.2). In a recent review describing mutations involved in CHI [34], 92 distinct mutations in CHI patients were described

for the *SUR 1* gene, and about 12 mutations were described for the *Kir 6.2* gene, but only 11 mutations of *SUR 1* and 8 mutations of *Kir 6.2* were registered at Ensembl Human Gene Mutation Data Base (www.ensembl.org). *ABCC8* gene mutations are the cause of 50-60% of neonatal cases of CHI, and only 10-15% of cases are due to *KCNJ11* gene mutations. Many of these mutations, including splice-site, missense, nonsense, insertions, and deletions, are located in the region of exons 33-39 of the *ABCC8* gene, which codes for the NBF-2 (Nucleotide Binding Fold 2), one of the two ATP molecule binding sites of the *SUR 1* protein that activates (opens) the K^{ATP} channels. This region is of the *ABCC8* gene is essential for channel function [3, 31, 32, 34, 35]. For this reason, we selected the exons 33-37 to be sequenced in this study. No mutations or new polymorphisms were found in these exons in the 4 patients whose peripheral blood was available, although the presence of mutations in other exons of *ABCC8* cannot be ruled out. Data in the literature show that genetic screening of all the 39 exons of *SUR 1* and of the single exon of *Kir 6.2* did not find mutations, and could not define the genetic basis of the disease in more than 50% of patients with the diffuse form and 30% of patients with the focal form of CHI [3]. Despite the lack of recognized mutations in some patients, functional analyses of the pancreas of these patients have demonstrated a lack of K^{ATP} activity, and treating these patients with diazoxide was not effective. The dysfunctional channels could be determined by many factors, including abnormalities in proteins with a regulatory effect on K^{ATP} channel expression (genes transcription factors), alterations in protein synthesis or in the assembly mechanism of the 3-D structure of *SUR 1* and *Kir 6.2* proteins, trafficking abnormalities of these proteins from the endoplasmic reticulum, conducting abnormalities of K⁺ through the channels [3], and even changes in the

number of channels at the cell surface [36], as it is known that K^{ATP} channels are present mainly on the insulin granule membrane inside the cell [37] and are involved in granule docking and secretion. These patients without known mutations clearly illustrate how much remains to be discovered about factors regulating K^{ATP} channels in the pancreas. There is an enormous potential for studies of the molecular pathways and the genetic mutations involved in the pathogenesis of CHI for revealing aspects of cell biology that are directly relevant to the pathophysiology of insulin secretion in humans. According to our literature review, this is the first genetic study of CHI patients in Brazil, and we hope these results can be the starting point for future prospective studies looking for a better understanding of this intriguing disease.

Declaration of interest

There is no conflict of interest between the authors and the funding agency that would prejudice the impartiality of this work.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Grant 08/56032-0 to M.C.N.Z.

Acknowledgments

The authors thank Cristina Maria Podestá Guimarães, Andrea Monteiro Peixoto Sousa and Rosa Maria da Conceição Zanardi for technical assistance.

References

1. Glaser B, Landau H, Permutt MA. Neonatal Hyperinsulinism. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:55-61.
2. De Léon DD, Stanley CA. Mechanisms of Disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates. *Endocrinology & Metabolism* 2007;3(1):57-68.
3. Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A, Lindley KJ. Hyperinsulinism in Infancy : From Basic Science to Clinical Disease. *Physiol Rev* 2004;84:239-75.
4. Glaser B, Chiu KC, Anker R et al. Familial hyperinsulinism maps to chromosome 11p 14 -15.1, 30 cm centromeric to the insulin gene. *Nature Genetics* 1994;7:185-88.
5. Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N et al. Mutations in the Sulfonylurea Receptor Gene in Familial Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Science* 1995;268:426-29.
6. Thomas PM, Wohllk N, Huang E, Kuhnle U, Rabl W, Gagel RF, Cote GJ. Inactivation of the First Nucleotide-Binding Fold of the Sulfonylurea Receptor, and Familial Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Am J Hum Genet* 1996;59:510-18.
7. Thomas PM, Ye Y, Lightner E. Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Human Molecular Genetics* 1996;5(11):1809-12.

8. Nestorowicz A, Wilson BA, Schoor KP et al. Mutations in the sulfonylurea receptor gene are associated with familial hyperinsulinism in Ashkenazi Jews. *Human Molecular Genetics* 1996;5(11):1813-22.
9. Nestorowicz A, Inagaki N, Tohru G et al. A Nonsense Mutation in the Inward Rectifier Potassium Channel Gene, Kir 6.2, Is Associated With Familial Hyperinsulinism. *Diabetes* 1997;46(11):1743-48.
10. Tornovsky S, Crane A, Cosgrove KE et al. Hyperinsulinism of Infancy : Novel ABCC8 and KCNJ11 Mutations and Evidence for Additional Locus Heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6224-34.
11. Thornton PS, MacMullen C, Ganguly A et al. Clinical and Molecular Characterization of a Dominant Form of Congenital Hyperinsulinism Caused by a Mutation in the High-Affinity Sulfonylurea Receptor. *Diabetes* 2003;52:2403-10.
12. Shyng S-L, Ferrigni T, Shepard JB, Nestorowicz A, Glaser B, Permutt MA, Nichols CG. Functional Analysis of Novel Mutations in the Sulfonylurea Receptor 1 Associated With Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Diabetes* 1998;47:1145-51.
13. Rahier J, Sempoux C, Fournet JC et al. Partial or near-total pancreatectomy for persistent neonatal hyperinsulinaemic hypoglycemia : the pathologist's role. *Histopathology* 1998;32:15-19.
14. Rahier J, Guiot Y, Sempoux C. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia of infancy : a heterogeneous syndrome unrelated to nesidioblastosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:108-12.

15. Sempoux C, Guiot Y, Lefevre A, Nihoul-Fékété C, Jaubert F, Saudubray J-M, Rahier J. Neonatal Hyperinsulinemic Hypoglycemia : Heterogeneity of the Syndrome and Keys for Differential Diagnosis. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998;83(5):1455-61.
16. Sempoux C, Guiot Y, Dubois D, Nollevaux M-C, Saudubray J-M, Nihoul-Fékété C, Rahier J. Pancreatic B-Cell Proliferation in Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy : An Immunohistochemical Study of 18 Cases. *Mod Pathol* 1998;11(5):444-49.
17. De Lonlay P, Fournet J-C, Touati G et al. Heterogeneity of persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia. A series of 175 cases. *Eur J Pediatr* 2002;161:37-48.
18. DeLonlay P, Touati G, Robert J-J, Saudubray J-M. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia. *Semin Neonatol* 2002;7:95-100.
19. Suchi M, Thornton PS, Adzick NS, Macmullen C, Ganguly A, Stanley CA, Ruchelli ED. Congenital Hyperinsulinism Intraoperative Biopsy Interpretation Can Direct the Extent of Pancreatectomy. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1326-35.
20. Verkarre V, Fournet J-C, DeLonlay P et al. Paternal mutation of the sulfonylurea Receptor (SUR1) Gene and Maternal Loss of 11p15 Imprinted Genes Lead to Persistent Hyperinsulinism in Focal Adenomatous Hyperplasia. *J Clin Invest* 1998;102(7):1286-91.
21. Fournet J-C, Mayaud C, DeLonlay P et al. Unbalanced Expression of 11p15 Imprinted Genes in Focal Forms of Congenital Hyperinsulinism. *American Journal of Pathology* 2001;158(6):2177-184.

22. Sempoux C. Hyperinsulinisme Neonatal Persistant: les nouvelles découvertes en pathologie éclairent la pathophysiologie du syndrome et en dirigent l'approche thérapeutique. *Bulletin et Memoires de l'Academie Royale de Medecine de Belgique* 2003;158(5-6):291-97.
23. Suchi M, MacMullen CM, Thornton PS, Adzick NS, Ganguly A, Ruchelli ED, Stanley CA Molecular and immunohistochemical analyses of the focal form of congenital hyperinsulinism. *Modern Pathology* 2006;19:122-29.
24. Damaj L, le Lorch M, Verkarre V et al. Chromosome 11p15 paternal isodisomy in focal forms of neonatal hyperinsulinism. *J Clin Endocrin Metab* 2008 Dec;93(12):4941-7.
25. Kassem SA, Ariel J, Thornton PS, Hussain K, Smith V, Lindley KJ, Aynsley-Green A, Glaser B. p57 KIP2 Expression in Normal Islet Cells and in Hyperinsulinism of Infancy. *Diabetes* 2001;50:2763-769.
26. Kassem S, Ariel J, Thornton PS, Scheimberg J, Glaser B. Beta-Cell Proliferation and Apoptosis in the Developing Normal Human Pancreas and in Hyperinsulinism of Infancy. *Diabetes* 2000;49:1325-333.
27. Smith VV, Malone M, Risdon RA. Focal or Diffuse Lesions in Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy: Concerns about Interpretation of Intraoperative Frozen Sections. *Pediatric and Developmental Pathology* 2001;4:138-143.
28. Zerbini MC, Almeida W, Wakamatsu A, Marujo W, Lopes LHAC, Maksoud JG. DNA content and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in persistent neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia (PNHH). *Mod Pathol* 1994;7(1):149A.

29. De Lonlay-Debeney P, Poggi-Travert F, Fournet J-C et al. Clinical features of 52 neonates with hyperinsulinism. *The New England Journal of Medicine* 1999;340:1169-75.
30. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple *salting out* procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:12-15.
31. Aguilar-Bryan L, Bryan J. Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. *Endocrine Reviews* 1999;20(2):101-135.
32. Efrat S. Regulation of Insulin Secretion Insights from Engineered β -cell Lines. *Diabetic Medicine* 2000;17:91-104.
33. Bowens L, LU WG, De Krijger R. Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia* 1997;40:398-404.
34. Gloyn AL, Siddiqui J, Ellard S. Mutations in the Genes Encoding the Pancreatic Beta-Cell K^{ATP} Channel Subunits Kir 6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in Diabetes Mellitus and Hyperinsulinism. *Human Mutation* 2006;27(3):220-231.
35. Fournet JC, Junien C. The genetics of neonatal hyperinsulinism. *Horm Res* 2003;59(S1):30-4.
36. Sivaprasadarao A, Taneja TK, Mankouri J, Smith AJ. Trafficking of ATP-sensitive potassium channels in health and disease. *Biochemical Society Transactions* 2007;35(5):1055-59.
37. Geng X, Li L, Watkins S, Robbins PD, Drain P. The insulin secretory granules is the major site of K^{ATP} channels of the endocrine pancreas. *Diabetes* 2003;52:767-76.

TABLE 1: Clinical Data of CHI Patients

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Gender	F	F	M	F	F - twin	F	M	F - twin	M	F	M
Consanguinity of parents	no	Cousins 1°degree	no	no	cousins 1°degree	cousins 2°degree	cousins 2°degree	cousins 1°degree	no	no	no
Birth weight	2600 g premature	5390 g	4350 g	2790 g	1650 g premature	3200 g	3440 g	1590 g premature	3350 g	3340 g	4240 g
1° symptom	birth	birth	birth	birth	3 m	25 d	4 m	3 m	birth	5 m	birth
Blood glucose *	10 mg/dl	18 mg/dl	18.7 mg/dl	35 mg/dl	14 mg/dl	50 mg/dl	14 mg/dl	13 mg/dl	30 mg/dl	17 mg/dl	37 mg/dl
Insulin **	7.4 µU/ml	22 µU/ml	44 µU/ml	104 µU/ml	112 µU/ml	137 µU/ml	30 µU/ml	34 µU/ml	44 µU/ml	30 µU/ml	89 µU/ml
Glucagon ***	Inconclusive	+	NP	NP	+	Inconclusive	+	+	+	+	+
Diazoxide administration	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Age at surgery	26 d	50 d	4 m 6d	4 m 23d	6 m	6 m 20d	7 m 10d	8 m 12d	12 m	13 m 5d	10 m 14d
Pancreatectomy	95%	98%	95%	90%	95%	95%	95%	95%	98%	98%	98%
Follow – up	death - 31 days	PMD	D / PMD	normal	D - 11 years	D / PMD	normal	D - 11 years	D / PMD	D / PMD	D

D:Diabetes; PMD: Psycho-Motor Delay.

All patients have the diffuse form of CHI except patient 11, whoich has the focal form.

Blood samples for molecular genetic evaluation were available for patients 5, 8, 9 and 11.

Blood values:

* Hypoglycemia = blood glucose< 40 mg/dl

** Hyperinsulinemia = Insulin > 5µU/ml when blood glucose< 50 mg/dl

*** Test positivity = rise in blood glucose > 30 mg/dl after 0.03 mg/kg IV of glucagon

NP – not performed

TABLE 2: Primers used for amplification of exons 32 to 36 of gene ABCC8 (SUR 1)

Primer	Sequence	Temperature of annealing (°C)	Size of fragment (bp)
33s 33 ^a	GAG GAC AGA ACT AAG CGA ACC A CCC TCT CCC TGA GCC TCT C	53	195
34s 34 ^a	CCC ATG CCT GGT GGC TGA G ACG CCT GTC CTG CAG CAT TG	53	207
35s 35 ^a	GCA TAG AGC TAT TCC CAG CAG C TGG GGT GCC CGC CTT ACA AC	52	166
36s 36 ^a	TCA CCG CCT TCC CCT GCA C TCC AGA TCT GAT GGA ACT GAG	52	211
37s 37 ^a	GAC CCT GCT CCC TCC CTA C AGG GTC CTT GAG TGC CCA AC	52	197

TABLE 3: Primers used for amplification of the only exon of gene *KCNJ11* (Kir 6.2)

Primer	Sequence	Temperature of annealing (°C)	Size of fragment (bp)
Fragment 1	GACTCTGCAGTGAGGCCCT GTCACCAGCATCCACTCCTT	53	430
Fragment 2	GCCACACACATTGCTCATCT CTTCATGCTACGTGTGGGTG	50	410
Fragment 3	GACCTCATCTTCAGCAAGC TTGTGCCATTGTAGCTGAG	50	470
Fragment 4	ATCATCGTCATCCTGGAAGG ATCCAGGGTGTACAAGGCA	50	460

TABLE 4: Histopathology of Diffuse CHI Patients

Age Groups	≤ 3 months						> 3 months				% of patients with the histological criteria
	1 *	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Patients	1 *	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Age at surgery	26d	50d	4m 6d	4m 23d	6m	6m 20d	7m 10d	8m 12d	12m	13 m 5d	
Histological Criteria	Semi-quantitative analysis: mild (+) moderate (++) marked (+++)										
Maturation Criteria											
Ductulo-insular complexes (budding-off of β-cells from duct epithelium)	-	-	-	+	++	+++	+++	+	++	+	63.6 %
Septal islets	-	+	-	+	-	++	+	-	-	-	36.3 %
Centroacinar small β-cell clusters	-	-	-	-	+	++	-	+	-	-	27.2 %
Spreading isolated β-cells	-	++	-	-	-	++	-	+++	-	-	27.2 %
Functional Criteria											
Nucleomegaly (β-cell nuclear enlargement >3x endocrine adjacent nuclei)	-	+	-	+	++	+++	++	-	-	+	54.5 %
β-cells with abundant cytoplasm	-	+	-	+	-	++	-	-	-	-	27.2 %

* The pancreas of patient 1 was all included for histology and was considered normal because it did not show any of the histological criteria above.

** Patient 11 corresponded to the focal form of CHI

TABLE 5: Histology of Controls \leq 3 months of age

TABLE 6: Histology of Controls > 3 months of age

TABLE 7: Mean values of β -cells Ki-67-LI in controls and in diffuse form CHI patients according to age

	Age	Mean	SD	N
Controls	\leq 3 months	1.85	.37	10
	> 3 months	1.90	.52	9
	Total	1.87 *	.44	19
CHI Patients	\leq 3 months	2.41	.45	2
	> 3 months	2.42	.40	8
	Total	2.41 *	.38	10

* $P = 0.009$

TABLE 8: Results of automatic sequencing of the unique exon of *KCNJ11* (Kir 6.2). Alleles found in each polymorphism. Mutations were absent.

Polymorphisms	Allele	5	8	9	11
rs41309072	G/C	C	C	C	C
rs5219	A/G	G	G	G	G
rs41314517	T/C	T	T	T	T
rs28936678	T/C	T	T	T	T
rs5218	C/T	C/T	C/T	T	T
rs5217	G/A	G	G	G	G
rs5216	C/G	C	C	C	C
rs1800467	C/G	C	C	C	C
rs1800854	C/A	C	C	C	C
rs5215	G/A	A	A	A	A
rs5214	A/G	A	A	A	A
rs35043381	C/-	C	C	C	C
rs8175351	G/A	G	G	G	G
rs41282930	C/G	C	C	C	C

TABLE 9: Results of automatic sequencing of the exons 33-37 of *ABCC8* (SUR 1). Alleles found in each polymorphism. Mutations were absent.

Polymorphisms	Allele	5	8	9	11
rs1129799	G/A	G	G	G	G
rs28936370	G/C	G	G	G	G
rs757110	G/T	T	T	T	T
rs28938469	C/T	C	C	C	C

Legends to Figures

FIG. 1 **A:** Ductulo-insular complex (IHC insulin/Ki- 67, X1000 – case 7); **B:** Ductulo-insular complex (IHC insulin, X1000 – case 6); **C:** Fibrous septal islets (H&E, X100 – case 2); **D:** Irregular sized islets, septal islets and spreading of isolated β -cells (H&E, X100 – case 5); **E:** Nucleomegaly and enlarged cytoplasm of endocrine cells (H&E, X200 – case 5); **F:** Proliferating β - cell - Ki-67-LI = 1,99 % (IHC insulin/Ki-67, X1000 – control 16)

FIG. 2 **A :** Focal CHI – (IHC insulin, X 12,5 – case 11). **B:** Focal CHI – focal adenomatous area with Ki-67-LI = 10.15% (IHC insulin/Ki- 67, X 100 – case 11); **C (case 3) – D (case 4) – E (control 17) :** Clusters of islets (IHC insulin/Ki- 67, X 12,5 and X 40)

FIGURE 1

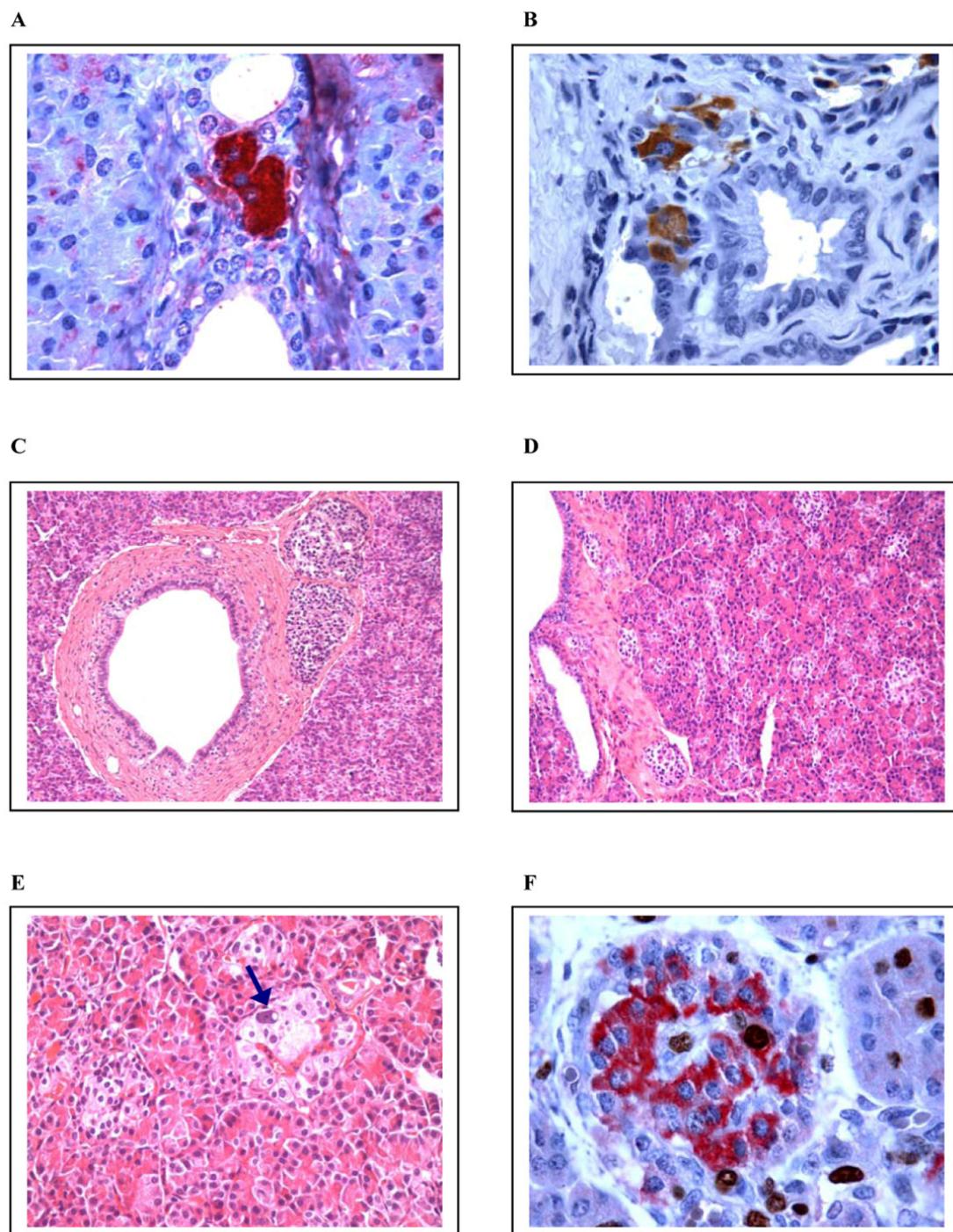
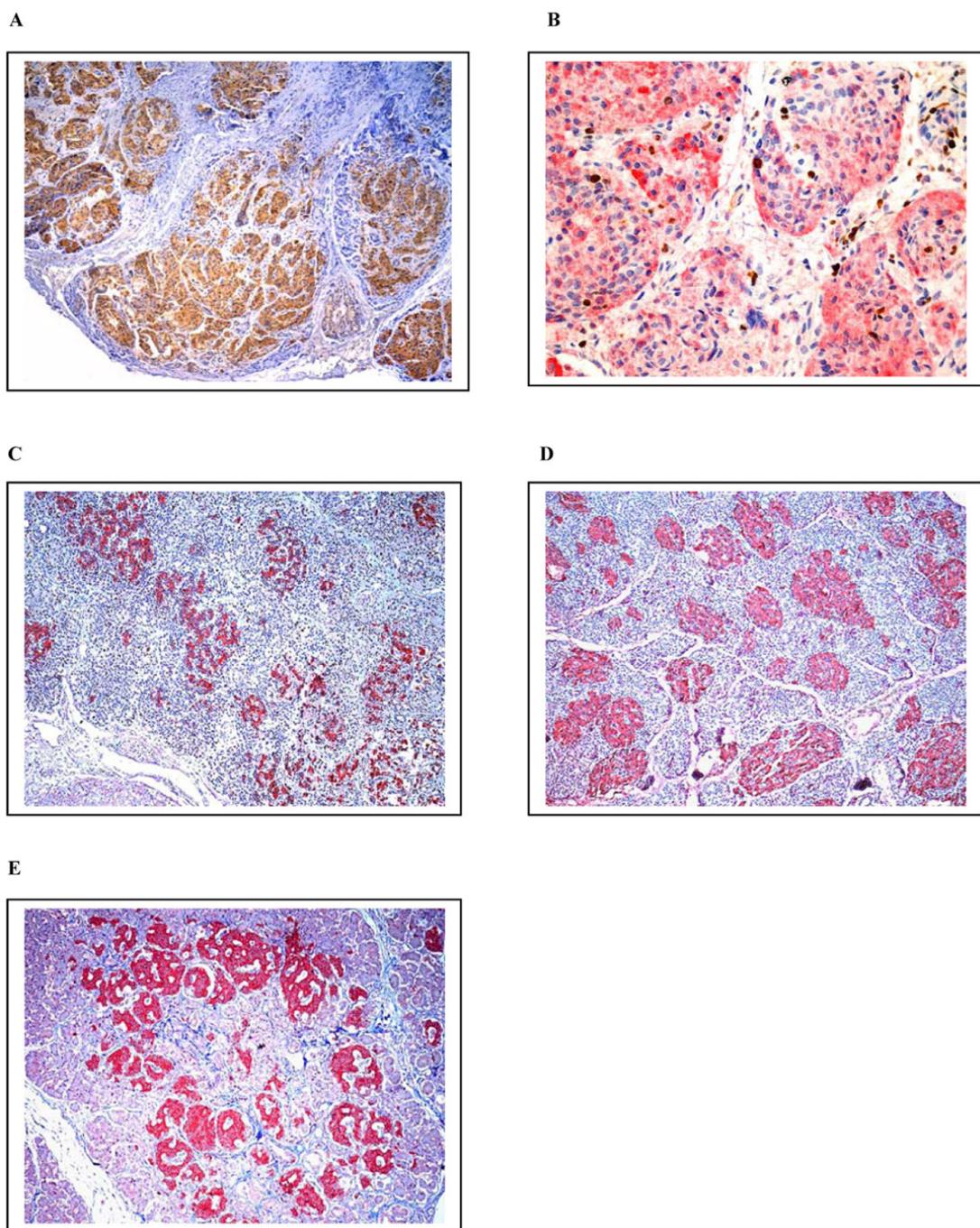


FIGURE 2



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.01.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 1192/05, intitulado: "Estudo histopatológico, molecular e funcional da hipoglicemia hipersulinêmica persistente da infância (PHHI) envolvendo os canais de potássio." apresentado pelo Departamento de PATOLOGIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini

Pesquisador (a) Executante: Dra. Silvana Maria Lovisolo

CAPPesq, 26 de Janeiro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br
VCN