

## INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN ENDOCRINOLOGÍA PEDIÁTRICA

## Canales de potasio y gen de la insulina: ¿Cuál es su papel en la diabetes infantil?

Itxaso Rica, Inés Urrutia\*, Rosa Martínez\*, Amaia Vela, Gema Grau, Amaia Rodríguez y Luis Castaño\*.

*CIBERDEM. Sección de Endocrinología Pediátrica. Unidad de Investigación en Endocrinología y Diabetes\*. Hospital de Cruces. Bizkaia*

El objetivo de la investigación traslacional es, en un primer paso, aplicar los conocimientos biomédicos derivados de la investigación básica a la investigación clínica y posteriormente, a la práctica asistencial. Es labor conjunta de los investigadores básicos y de los clínicos conseguir que exista una transferencia efectiva, de los nuevos conocimientos derivados de la investigación a la asistencia, con el objetivo de mejorar su calidad en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades, persiguiendo optimizar, así, la salud de la población.

En el ámbito de la endocrinología pediátrica los avances que se han desarrollado en los últimos años, en gran parte derivados de la genética molecular, han permitido que seamos capaces de entender mejor la complejidad de muchas patologías y de ofertar, un tratamiento más adecuado a los pacientes. Este hecho no hubiera sido posible sin una estrecha colaboración conjunta de investigadores básicos y clínicos, colaboración que debemos mantener y potenciar en un futuro.

Los cambios experimentados en el conocimiento de la fisiopatología de la diabetes *mellitus* son un claro ejemplo de este hecho. En la década de los 80, la diabetes se clasificaba en base a la edad de diagnóstico de la enfermedad y a la terapéutica utilizada en diabetes insulino dependiente y no insulino dependiente. Ya en el año 1997<sup>(1)</sup> la Asociación Americana de Diabetes propuso una nueva clasificación de la diabetes basada en un fundamento etiológico. Esta clasificación incluía a la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y un tercer subgrupo de "otros tipos específicos de diabetes", que agrupaba, entre otras, a 4 enfermedades entonces conocidas originadas por defectos genéticos de la célula  $\beta$ . Desde entonces, hasta nuestros días, la lista de genes implicados en la génesis de diabetes se ha

ido ampliando. Hoy englobamos a estas enfermedades en el grupo de diabetes monogénica.

La investigación traslacional ha permitido que podamos identificar correctamente algunos defectos genéticos que conllevan una disfunción de la célula  $\beta$  y originan diferentes fenotipos clínicos de diabetes, que se transmiten con un patrón de herencia autosómica dominante ó recesiva. Las diabetes monogénicas incluyen a las inicialmente conocidas como "diabetes tipo Mody" (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) y a gran parte de las antes denominadas "diabetes neonatal". Actualmente, conocemos más de 10 genes responsables de los diferentes subtipos de diabetes monogénica. La identificación del tipo concreto de alteración genética de cada paciente nos permite dar un consejo genético adecuado, informar con mayor precisión sobre el pronóstico de la patología e instaurar, en algunos casos, un tratamiento específico diferente de la insulino terapia.

Las diabetes monogénicas son enfermedades poco frecuentes, si las comparamos con la diabetes tipo 1 ó con la tipo 2. No hay estudios epidemiológicos que hayan establecido su prevalencia pero se puede estimar que constituyen un 10-15% de la diabetes en la edad pediátrica. Es posible que su prevalencia sea mayor y que algunos pacientes diagnosticados de diabetes tipo 1 ó diabetes tipo 2, padezcan mutaciones genéticas no conocidas. Nos debemos plantear esta opción etiológica en diabetes diagnosticada en los primeros años de la vida sin presencia de autoinmunidad antipancreática, en pacientes diagnosticados de diabetes tipo 2 que no asocien obesidad ni insulino resistencia, y en familias en las que exista una carga de herencia autosómica dominante de diabetes.

En este Capítulo nos vamos a centrar en la diabetes monogénica originada por mutaciones en los ge-

Tabla 1. Espectro clínico más frecuente en los pacientes con diabetes secundaria a mutaciones en *KCNJ11*, *ABCC8* o *INS*.

Mutación	Alteración funcional	Debut (meses)	Herencia	Evolución diabetes	Peso natal (P)	Terapia 1ª elección
<i>KCNJ11</i>	Subunidad Kir6.2	1-3	AD	Permanente 80%	P10-25	Sulfonilureas
<i>ABCC8</i>	Receptor sulfonilurea	1-3	AD-AR	Permanente 50%	P10-25	Sulfonilureas
<i>INS</i> heterocigosis	Molécula preproinsulina	1-24	AD	Permanente > 90%	P25-50	Insulina
<i>INS</i> homocigosis	Insulina	1er mes	AR	Permanente 75%	< P3	Insulina

Peso natal (P): percentil medio de los pacientes.

nes que codifican las 2 subunidades del canal de  $K^+$  de la célula  $\beta$  pancreática, y en la diabetes por mutaciones en el gen de la insulina. Repasaremos los mecanismos fisiopatológicos de las mismas, el fenotipo clínico de diabetes que generan y, finalmente, la terapia adecuada para estos pacientes, datos que se sintetizan en la Tabla 1.

### 1. Alteraciones en el canal de $K^+$ y diabetes.

Los canales de  $K^+$  sensibles al ATP ( $K^+$ -ATP) son complejos hetero-octaméricos constituidos por 4 subunidades Kir6.2, codificadas por el gen *KCNJ11* y 4 subunidades SUR1 (receptor de las sulfonilureas), codificadas por el gen *ABCC8*. Estos canales están situados en las membranas de algunos tipos celulares incluyendo la célula  $\beta$ . En ésta acoplan el metabolismo intracelular que finaliza con la secreción de insulina a la carga eléctrica de la membrana celular. Cuando la glucosa se introduce en la célula y se fosforila a glucosa 6-fosfato se inicia una ruta metabólica que origina un aumento del cociente ATP/ADP intracelular. El incremento del ATP estimula el canal provocando su cierre, hecho que produce una despolarización de la membrana celular y la apertura de los canales de  $Ca^{++}$ . La entrada y el posterior aumento de los niveles de  $Ca^{++}$  intracelular favorecen la transcripción de factores intranucleares que finalizan con la síntesis y posterior liberación de insulina. Por otro lado, la activación de la subunidad SUR1 a través de mononucleótidos intracelulares favorece la apertura del canal de  $K^+$ -ATP y la ausencia de secreción de insulina. En condiciones normales existe un equilibrio entre los dos mecanismos activación de Kir6.2 y de SUR1, regulado por las concentraciones de glucosa plasmáticas.

La subunidad Kir6.2 está compuesta por 2 dominios transmembrana unidos por un bucle extracelular que, parcialmente, se introducen en la membrana para constituir el punto de unión al  $K^+$ , y dos dominios intracelulares. En 2004 se describieron las

primeras <sup>(2,3)</sup> mutaciones activadoras en heterocigosis del gen *KCNJ11* como causa de diabetes. Las mutaciones generan una disminución de la sensibilidad del canal al ATP o una distorsión espacial del mismo, que impide su cierre provocando una secreción de insulina disminuida, hecho que causa una diabetes diagnosticada en general en los primeros meses de la vida <sup>(2-6)</sup>.

La subunidad SUR1 tiene 3 dominios transmembrana y dos intracitoplasmáticos de unión a nucleótidos- $Mg^{++}$ . En condiciones de funcionalidad normal, la activación de SUR provoca una hiperpolarización de la membrana que imposibilita la apertura de los canales de  $Ca^{++}$  y, por lo tanto, se inhibe la secreción de insulina. En 2006 se describieron las primeras mutaciones del SUR1 causantes de diabetes <sup>(5,7)</sup>. El resultado de las mismas es una sobreactivación patológica de la subunidad que origina una menor proporción de canales cerrados y, por lo tanto, un descenso de la secreción de insulina <sup>(7-9)</sup>.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes con alteraciones en el canal de  $K^+$ -ATP son diagnosticados de diabetes a una edad precoz, en general durante los 3 primeros meses de la vida. Tienen una disminución moderada del peso neonatal, que se sitúa como media en los percentiles bajos de la normalidad y un índice ponderal adecuado <sup>(2, 3,10)</sup>. En un 30-40% de las ocasiones hay cetoacidosis al debut. La diabetes puede ser permanente ó transitoria. Los pacientes con mutaciones en Kir6.2 tienen diabetes permanente en el 80% de los casos. Cuando la diabetes es transitoria la remisión se produce pasados 3-6 meses, aunque se han comunicado algunas más tardías (a los 18 meses de edad). En las formas transitorias se han descrito recidivas de la diabetes en etapas posteriores de la vida, lo que nos permite considerarla como una enfermedad trifásica: diabetes de inicio neonatal, periodo libre de enfermedad y diabetes de diagnóstico en la etapa posterior.

Los canales de K<sup>+</sup>-ATP se distribuyen por otros órganos de la economía, fundamentalmente músculo y neuronas. Hasta un tercio de los pacientes con alteraciones en el canal asocian alteraciones neurológicas con un espectro amplio de manifestaciones. Las mutaciones más severas ocasionan el denominado síndrome DEND que conlleva diabetes neonatal permanente, retraso del desarrollo neurológico, hipotonía y epilepsia <sup>(11-13)</sup>.

Desde el año 2004 se han descrito más de 100 mutaciones que afectan a *KCNJ11* ó a *ABCC8*, todas ellas *missense*. Con el avance de los estudios funcionales, en la mayor parte de los casos, se encuentra una buena correlación entre el tipo de mutación, la repercusión funcional del canal y el fenotipo clínico. El impacto de las mutaciones depende del cambio de aminoácido que ocasiona y del lugar estructural de la proteína donde se produce la alteración. En la subunidad Kir6.2 hay mutaciones que, generalmente, afectan al dominio de unión con el ATP, que cursan solo con diabetes y otras, que ocasionan una distorsión y mayor severidad funcional del canal que se relacionan con el síndrome DEND <sup>(14)</sup>. Sin embargo se han descrito familias afectas por la misma mutación con formas clínicas diferentes. Esto nos permite especular con la posibilidad de que existan otros factores ambientales o epigenéticos, que tengan importancia en esta fisiopatología <sup>(16,17)</sup>.

En la mayoría de pacientes con diabetes por mutación en heterocigosis en el canal de K<sup>+</sup>-ATP las mutaciones son *de novo*. Los portadores de esta enfermedad pueden transmitirla al 50% de su descendencia. Los progenitores sanos tienen un riesgo mínimo, pero existente, de transmitirla a un nuevo hijo dado que se han descrito casos de mosaicismo en línea germinal <sup>(18,19)</sup>. En un 40% de los pacientes afectados por mutaciones en *ABCC8* se ha demostrado una herencia autosómica recesiva <sup>(15)</sup>.

## 2. Mutaciones en el gen de la insulina y diabetes

La insulina es el principal producto sintetizado por las células β pancreáticas. El 20% del total del ARNm celular se traduce en su síntesis, constituye el 10% del total proteico intracelular y es el 50% de la proteína secretada por la célula. La proteína que se sintetiza en primer lugar a partir del gen de la insulina es la "preproinsulina", molécula de 110 aa en cadena sencilla que incluye las cadenas A y B de la insulina, un péptido señal y el péptido C. Su proteólisis posterior da lugar a la "proinsulina", molécula que adquiere ya una estructura terciaria mediante dos puentes bisulfuros que unen las cadenas A y B; finalmente se secreta la molécula de insulina de forma independiente al péptido C.

La insulina bovina fue la primera proteína que se secuenció en 1951. Nicol *et al.* una década des-

pués secuenciaron la insulina humana y Oyer en 1971 la proinsulina; en 1979 se secuenció por completo la molécula de la preproinsulina y Bell. *et al.* en 1980 secuenciaron el gen que regula su síntesis INS y que se sitúa en cromosoma 11 (11p15) <sup>(20)</sup>.

Stoy *et al.* describieron en 2007 por primera vez mutaciones en heterocigosis en el gen INS como causa de diabetes <sup>(21)</sup>. Eran mutaciones *missense* que originaban un cambio en algunos residuos de la molécula de insulina distorsionando su conformación espacial. Las 10 primeras mutaciones descritas afectaban a 21 pacientes procedentes de 16 familias, todos ellos afectados de diabetes neonatal permanente. La edad media de diagnóstico era 9 semanas de vida pero había cierta heterogeneidad clínica; 3 pacientes fueron diagnosticados en el segundo semestre y uno había sido diagnosticado de diabetes tipo 2 a los 30 años de edad.

En el debut suele existir cetoacidosis o una marcada hiperglucemia con niveles de péptido C disminuidos o indetectables. El peso al nacimiento de estos pacientes se sitúa en los límites bajos de la normalidad (percentil 20), reflejando una insuficiente secreción de insulina intraútero. Como curiosidad, los pacientes diagnosticados con mayor edad, tenían como grupo un peso al nacimiento más cercano a la media. Este hecho se puede explicar pensando que en función del tipo de mutación, la secreción de insulina intraútero y la pérdida de función postnatal, están más o menos alteradas <sup>(21)</sup>.

Un año después, el grupo francés liderado por M. Polack <sup>(22)</sup>, investigó la prevalencia de mutaciones en INS en 38 pacientes afectados de diabetes diagnosticada en los primeros meses de la vida. En el 10% de los pacientes encontraron mutaciones *missense* en heterocigosis. Habían sido diagnosticados a una edad media de 8 meses y algunos de ellos debutaron con cetoacidosis. El peso de los recién nacidos se situó en la parte baja de la normalidad.

Las mutaciones descritas en el gen de la insulina afectan a regiones críticas de la molécula de la preproinsulina causando alteraciones en su proteólisis, un incremento del *stress* en el retículo endoplasmático celular y la muerte celular por apoptosis <sup>(20,22,23)</sup>.

El espectro clínico de diabetes debido a mutaciones en heterocigosis en INS es variable <sup>(20-25)</sup>. El fenotipo más frecuente es una diabetes insulino-dependiente, permanente, no autoinmune diagnosticada en los 6 primeros meses de vida. Con menos frecuencia se han encontrado mutaciones en pacientes con diagnóstico posterior y en diabetes previamente etiquetadas de tipo Mody o de tipo 2 <sup>(22,24-28)</sup>. Globalmente esta etiología explica al menos un 3-5% de los casos diagnosticados después del

6º mes de edad. La herencia es AD pero muchas mutaciones son *de novo*, habiéndose descrito casos compatibles con mosaicismos en línea germinal <sup>(20)</sup>.

Para finalizar, existen dos modelos animales de ratones con diabetes secundaria a mutaciones en heterozigosis en el gen INS que han ayudado a entender esta enfermedad <sup>(29, 30)</sup>. Los ratones padecen una diabetes precoz con una gran hipoinsulinemia. Se ha objetivado una reducción en el número de células  $\beta$  y de su contenido de insulina, sin que exista un fenómeno inflamatorio. En los ratones Akita, se observan alteraciones intracelulares con disminución de gránulos secretorios de insulina y alteraciones en la proteólisis que causan depósito intracitoplasmático de la misma y apoptosis celular.

En 2010 Garin *et al.* describieron mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta, en el gen INS como causa de diabetes diagnosticada en el periodo neonatal <sup>(31)</sup>. Los mecanismos patogénicos encontrados son diversos e incluyen deleciones en el gen de la insulina, alteraciones del promotor con inhibición de la señal de transcripción intracelular o mutaciones que causan un ARNm inestable. Todas ellas resultan en una síntesis disminuida de proinsulina y déficit insulínico secundario. En la serie descrita de 21 pacientes procedentes de 15 familias, el 67% habían desarrollado una diabetes permanente de inicio neonatal, un 24% una diabetes transitoria y el 9% estaba diagnosticado de DM1 no autoinmune.

Debemos sospechar esta patología en pacientes con diabetes diagnosticada en los primeros días de vida, con un peso neonatal muy disminuido (< percentil 3), sin asociar manifestaciones extrapancreáticas y asociando el antecedente de consanguinidad. El fenotipo de la diabetes neonatal es similar al de los pacientes con alteraciones del *imprinting* en 6q24, y refleja un déficit grave de insulina intraútero, que es mayor en las formas permanentes.

### 3. Actitud terapéutica

Retomando el objetivo de la investigación traslacional, la diabetes por mutaciones en el canal de K<sup>+</sup>-ATP es un claro ejemplo del beneficio que, desde el punto de vista asistencial, ha supuesto un descubrimiento genético. El 90% de los pacientes afectados por este trastorno responden adecuadamente a una terapia con sulfonilureas (SU), hecho que ha cambiado la vida de muchos pacientes que, anteriormente, estaban abocados a un tratamiento con insulina de por vida <sup>(32-35)</sup>.

Las sulfonilureas bloquean la subunidad SUR1 del canal, favoreciendo el cierre del mismo de forma independiente a los niveles de ATP. La droga que se ha empleado mayoritariamente es la glibenclá-

mida, sulfonilurea que tiene afinidad por los receptores SUR1 a nivel de la célula  $\beta$  pancreática y por los SUR2 que se distribuyen en nervios, músculo y cerebro. Este hecho explica que en muchas ocasiones los pacientes que padecen el síndrome DEND experimenten una notable mejoría desde el punto de vista neurológico <sup>(36, 37)</sup>. La dosis que se precisa es notablemente superior a la que se utiliza para el tratamiento de pacientes adultos con diabetes *mellicus* tipo 2, y además varía en función de la subunidad afectada, siendo superior en las mutaciones en *KCNJ11* <sup>(38)</sup>. Las sulfonilureas no tienen aprobada su indicación terapéutica en la edad pediátrica en España por lo que el tratamiento debe instaurarse dentro de un ensayo clínico o por uso compasivo.

Pearson *et al.* <sup>(32)</sup> publicaron en 2006 los primeros resultados que mostraban el éxito del tratamiento con glibenclámidia en 49 pacientes con diabetes neonatal permanente por alteraciones en Kir6.2. Se consiguió una disminución media de 1,5 en el valor de la HbA1c, a los 3 meses del inicio de la terapia y la mejora se mantuvo durante el 1º año de seguimiento. El protocolo utilizado comenzaba con una dosis de 0,1 mg/k/12 horas que se iba incrementando de forma progresiva, al mismo tiempo que se retiraba el tratamiento insulínico, hasta alcanzar un máximo de 0,8 mg/k/día. Dentro de los efectos adversos comunicados, destacaba sólo la aparición de molestias abdominales y diarrea auto-limitada, que en ningún caso obligó a suspender la medicación.

La terapia fracasó en 5 pacientes, 4 de los cuales asociaban algún tipo de alteración neurológica. Esto se debe a que la respuesta al tratamiento con sulfonilureas está condicionada por el tipo de mutación <sup>(32, 33)</sup>. Las mutaciones más frecuentemente descritas responden pero hay mutaciones menos frecuentes (Q52R, I296L, L164P) que afectan a la cinética intrínseca del canal en las que a veces, el tratamiento no es eficaz. Son este segundo subgrupo las que con mayor frecuencia asocian alteraciones neurológicas. No obstante, existen excepciones y se han comunicado pacientes con síndrome DEND (mutación G53D o V59M) en los que el tratamiento con glibenclámidia sí ha sido eficaz. En estos casos, además de corregir la hiperglucemia se consigue una clara mejoría de los síntomas neurológicos <sup>(36, 37)</sup>.

Dado que las mutaciones en SUR1 causan con menos frecuencia diabetes permanente la experiencia con el tratamiento con sulfonilureas en pacientes pediátricos es menor. E. Corner *et al.* <sup>(35)</sup> mostraron el éxito de la terapia con glibenclámidia en 4 pacientes. Uno de ellos, portador de una mutación en ABCC8, tenía hipoglucemias frecuentes con una dosis baja de glibenclámidia por lo que fue sustituida por tolbutamida que mostró ser eficaz. Rafiq

M *et al.* en 2008 mostraron resultados beneficiosos con el uso de glibenclamida, comparables a los obtenidos en pacientes con alteraciones en Kir6.2 en una serie de 23 personas con diabetes por mutaciones en *ABCC8* <sup>(38)</sup>. Así mismo se ha mostrado la eficacia en pacientes con el síndrome de DEND por mutaciones en *ABCC8* <sup>(39)</sup>.

#### 4. Conclusiones

La diabetes originada por mutaciones en heterocigosis en los genes *KCNJ11*, *ABCC8* o *INS* y la diabetes por mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en *INS*, son subtipos de diabetes monogénica. Son enfermedades poco prevalentes a día de hoy. El descubrimiento de estas patologías, derivado de la investigación traslacional, permite hacer un asesoramiento genético adecuado y elegir la terapia más eficaz: las alteraciones en el canal de K<sup>+</sup>-ATP responden mayoritariamente al tratamiento con sulfonilureas y la insulino terapia sigue siendo la terapia de elección en mutaciones en *INS*.

Globalmente, debemos sospechar estas alteraciones en pacientes diagnosticados de diabetes en los primeros meses de la vida en ausencia de autoinmunidad antipancreática y de tipaje HLA de riesgo para diabetes tipo 1 <sup>(40)</sup>. Son por ello, un grupo de etiologías que explica la categoría de diabetes tipo 1 no autoinmune. Los pacientes tienen el antecedente de un peso natal inferior a la media, con una afectación variable del mismo y en el 30-50% de las ocasiones debutan en cetoacidosis; ambos hechos reflejan una insulino penia de intensidad variable intraútero y postnatal.

Éstos son los factores a considerar a la hora de solicitar estudios genéticos en un caso clínico sugestivo:

- Por la prevalencia que tienen estos trastornos y las características estructurales de los genes, el orden a estudiar sería *KCNJ11*, *INS* y por último, *ABCC8*.
- Si el fenotipo corresponde a una diabetes de debut neonatal por alteraciones en la impronta en 6q24, con debut los primeros días de vida y gran distrofia (peso natal < percentil 3) tras descartar esta etiología la primera posibilidad diagnóstica es una mutación en homocigosis en *INS*, especialmente si se conoce consanguinidad entre los progenitores.
- Si la diabetes se diagnostica pasados los 6 primeros meses de vida, el primer supuesto a descartar es una mutación en heterocigosis en *INS*.

Desde el punto de vista de las formas de diabetes, las mutaciones en *KCNJ11* y en *INS* causan

predominantemente diabetes permanente; las mutaciones en *ABCC8* pueden originar formas permanentes o transitorias de diabetes, con riesgo de recurrencia en etapas posteriores de la vida en aquellos pacientes en los que hay una remisión. Las mutaciones en homocigosis de *INS* también pueden presentar formas transitorias.

Gran parte de las mutaciones encontradas son *de novo*, pero el consejo genético es parte del tratamiento de estos pacientes. Se han descrito progenitores portadores de una mutación en línea germinal, hecho que condiciona que exista un riesgo de recidiva en otros hijos de 2-3%, a pesar de que los padres no porten la mutación en sangre periférica.

Para finalizar, el tratamiento indicado en pacientes con diabetes por alteraciones en el canal de K<sup>+</sup>-ATP es terapia oral con sulfonilureas. La medicación que se ha utilizado con más frecuencia y ha mostrado la eficacia en estos pacientes es la glibenclamida. Como no está aprobado el uso de sulfonilureas en diabetes infantil, la medicación se debe iniciar dentro de un ensayo clínico o a través de un uso compasivo, en centros en los que exista un equipo multidisciplinar experimentado en el manejo de la diabetes infantil.

La contribución que tienen las mutaciones en *KCNJ11*, *ABCC8* o *INS* a la diabetes infantil es relevante, a pesar de su baja prevalencia, por las implicaciones que conlleva desde los puntos de vista clínico, terapéutico y de asesoramiento genético. Es posible que en un futuro no lejano se demuestre que su papel en la etiología de otros tipos de diabetes es mayor, dado que ya han sido descritos pacientes con estas mutaciones diagnosticados inicialmente de diabetes tipo 1, diabetes tipo Mody o diabetes tipo 2.

#### Bibliografía

1. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1.183-1.197.
2. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS *et al.* Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 2004;350:1838-49.
3. Vaxillaire M, Populaire C, Busiah K, Cave H, Gloyn AL, Hattersley AT, Czernichow P, Froguel P, Polak M. Kir6.2 mutations are a common cause of permanent neonatal diabetes in a large cohort of French patients. *Diabetes* 2004; 53:2719-22.

4. Gloyn AL, Reimann F, Girard C, Edghill EL, Proks P, Pearson ER *et al*. Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum Mol Genet* 2005; 14:925-34
5. Proks P, Arnold AL, Bruining J, Girard C, Flanagan SE, Larkin B, Colclough K, Hattersley AT, Ashcroft FM, Ellard S. A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* 2006; 15:1793-800.
6. Girard CA, Shimomura K, Proks P, Absalom N, Castano L, Perez de Nanclares G, Ashcroft FM. Functional analysis of six Kir6.2 (KCNJ11) mutations causing neonatal diabetes. *Pflugers Arch* 2006; 453:323-32.
7. Babenko AP, Polak M, Cave H, Busiah K, Czer-nichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Vaxillaire M, Froguel P. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2006; 355:456-66.
8. Zhou Q, Garín I, Castaño L, Argente J, Muñoz-Calvo MT, Perez de Nanclares G and Shyng S. Neonatal Diabetes Caused by Mutations in Sulfonylurea Receptor 1: Interplay between Expression and Mg-Nucleotide Gating Defects of ATP-Sensitive Potassium Channels. *JCEM* 2010; 95(12): E473-8.
9. Aittoniemi J, Fotinou C, Craig TJ, de Wet H, Proks P and Ashcroft FM. Review SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009 Jan 27; 364(1514):257-67.
10. Rica I, Luzuriaga C, Pérez de Nanclares G, Estalella I, Aragonés A, Barrio R, Bilbao JR, Carles C, Fernández C, Fernández JM, Fernández-Rebollo E, Gastaldo E, Giral P, Gómez Vida JM, Gutiérrez A, López Siguero JP, Martínez-Aedo MJ, Muñoz M, Prieto J, Rodrigo J, Vargas F, Castaño L. The majority of cases of neonatal diabetes in Spain can be explained by known genetic abnormalities. *Diabet Med* 2007; 24: 707-13.
11. Shimomura K, Hörster F, de Wet H, Flanagan SE, Ellard S, Hattersley AT, Wolf NI, Ashcroft F, Ebinger F. A novel mutation causing DEND syndrome: a treatable channelopathy of pancreas and brain. *Neurology*. 2007 Sep 25; 69(13):1342-9.
12. Masia R, Koster JC, Tumini S, Chiarelli F, Colombo C, Nichols CG, Barbetti F. An ATP-binding mutation (G334D) in KCNJ11 is associated with a sulfonylurea-insensitive form of developmental delay, epilepsy, and neonatal diabetes. *Diabetes*. 2007 Feb; 56(2):328-36.
13. Peter Proks, Kenju Shimomura, Tim J. Craig, Christophe A.J. Girard and Frances M. Ashcroft. Mechanism of action of a sulphonylurea receptor SUR1 mutation (F132L) that causes DEND syndrome. *Hum. Mol. Genet.* (2007) 16 (16): 2011-2019.
14. Edghill E, Flanagan S and Ellard S. Permanent neonatal diabetes due to activating mutations in ABCC8 and KCN11. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11: 193-198.
15. Ellard S, Flanagan S, Girard C, Patch A, Harries L, Parrish A, Hattersley A, Ashcroft Permanent Neonatal Diabetes caused by dominant, recessive, or compound heterozygous SUR1 mutations with opposite functional effects. *Am J Hum Gen* 2007; 81: 375-382.
16. Klupa T, Kowalska I, Wyka K, Skupien J, Patch AM, Flanagan SE *et al*. Mutations in the ABCC8 (SUR1 subunit of the K(ATP) channel) gene are associated with a variable clinical phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Sep; 71(3):358-62.
17. Rubio-Cabezas O, Klupa T and Malecki T. Permanent neonatal diabetes mellitus: the importance of diabetes differential diagnosis in neonates and infants. *Eur J Clin Invest* 2011; 41: 323-333.
18. Edghill EL *et al*. Origin of de novo KCNJ11 mutations and risk of neonatal diabetes for subsequent siblings. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1773-1777.
19. Gloyn AI *et al*. Permanent neonatal diabetes due to paternal germline mosaicism for an activating mutation of the KCNJ11 gene encoding the Kir6.2 subunit of the  $\beta$ -cell potassium adenosine triphosphate channel. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3932-3935.
20. Stoy J, Steinert DF, Park S, Ye H, Philipson LH and Bell GI. Clinical and molecular genetics of neonatal diabetes due to mutations in the insulin gene. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11: 205-215.
21. Stoy J, Edghill EL, Flanagan SE, Ye H, Paz VP, Pluzhnikov A, Below JE, Hayes MG for the Neonatal Diabetes International Collaborative Group: Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 15040-15044.
22. Polak M, Dechaume A, Cavé H, Nimri R, Crosnier H, Vaxillaire M. Heterozygous Missense Mutations in the Insulin gene are linked to Permanent Diabetes appearing in the Neonatal Period or in Early-Infancy: a report from the French ND Study Group. *Diabetes* 2008; 57: 1115-1119.

23. Park SY, Ye H, Steiner DF, Bell GI. Mutant proinsulin proteins associated with neonatal diabetes are retained in the endoplasmic reticulum and not efficiently secreted. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 15;391(3):1449-54.
24. Edghill EL, Flanagan SE, Patch AM, Boustred C, Parrish A, Shields B *et al*. Insulin mutation screening in 1.044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. *Diabetes*. 2008 Apr; 57(4):1034-42.
25. Colombo C, Prozio O, Liu M, Massa O, Vasta M, Salardi S, Beccaria L, and the Early Onset Diabetes Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP). *J Clin Invest* 2008; 118 (6): 2148-2158.
26. Molven A, Ringdal M, Nordbø AM, Raeder H, Støy J, Lipkind GM *et al*. Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes. *Diabetes*, 2008 Apr;57(4):1131-5.
27. Bonfanti R, Colombo C, Nocerino V, Massa O, Lampasona V, Iafusco D *et al*. Insulin gene mutations as cause of diabetes in children negative for five type 1 diabetes autoantibodies. *Diabetes Care*, 2009 Jan;32(1):123-5.
28. O. Rubio-Cabezas, E. L. Edghill, J. Argente, A. T. Hattersley. Testing for monogenic diabetes among children and adolescents with antibody-negative clinically defined Type 1 diabetes. *Diabetic Medicine* 2009; 26 (10): 1070-1074.
29. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest*. 1999 Jan; 103(1):27-37.
30. Herbach N, Rathkolb B, Kemter E, Pichl L, Klaften M *et al*. Dominant-negative effects of a novel mutated Ins2 allele causes early-onset diabetes and severe beta-cell loss in Munich Ins2C95S mutant mice. *Diabetes*. 2007 May; 56(5):1268-76.
31. Garin I, Edghill EL, Akerman I, Rubio-Cabezas O, Rica I, Locke JM *et al*. Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 3105-3110.
32. Pearson P, Flechtner I, Njølstad P, Malecki M, Flanagan S, Larkin B, Ashcroft M, Polak M, Hattersley A, for the Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Switching from insulin to oral sulfonylurea in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *NEJM* 2006; 355 (5): 467-477.
33. Koster JC, Remedi MS, Dao C. ATP and sulfonylurea sensitivity of mutant ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in neonatal diabetes: implications for pharmacogenomic therapy. *Diabetes* 2005; 54: 2645-54.
34. Tonini G, Bizzarri C, Bonfanti R, Vanelli M, Cerutti F, Faleschini F and Barbetti F. Sulfonylurea treatment outweighs insulin therapy in short-term metabolic control of patients with permanent neonatal diabetes due to activating mutations of the KCNJ11 gene. *Diabetología* 2006; 49: 2210-2213.
35. Codner E, Flanagan S, Ugarte F, García H, Vidal T, Ellard S, Hattersley A. Sulfonylurea treatment in young children with neonatal diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30 (5): e28-e29.
36. Koster JC, Canario F, Peruzzi C, Colombo C, Nichols CG and Barbetti F. The G53D mutation in Kir6.2 is associated with neonatal diabetes and motor dysfunction in adulthood that is improved with sulfonylurea therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(3): 1054-106
37. Slingerland AS, Nuboer R, Haddes-Algra M, Hatterley AT, Bruining GJ. Improved motor development and good long-term glycaemic control with sulfonylurea treatment in patient with the syndrome of intermediate development delay, early-onset generalized epilepsy and neonatal diabetes associated with the V59M mutation in the KCNJ11 gene. *Diabetología* 2006; 49: 2559-2563.
38. Rafiq M, Flanagan SE, Patch AM, Shields BM, Ellard S, Hattersley AT; Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Effective treatment with oral sulfonylureas in patients with diabetes due to sulfonylurea receptor 1 (SUR1) mutations. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31(2):204-9.
39. Zwaveling-Soonawala N, Hagebeuk EE, Slingerland AS, Ris-Stalpers C, Vulsma T, and van Trotsenburg AS. Successful transfer to sulfonylurea therapy in an infant with developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes (DEND) syndrome and a novel ABCC8 gene mutation. *Diabetologia* 2011 February; 54(2): 469-471.
40. Rica I, Pérez de Nanclares G, Castaño I. Diabetes neonatal: defectos genéticos en la función de la célula B pancreática. *Revista Española de Pediatría* 2009; 65 (5): 478-487.