BIBLIOTECA Seubido in 29/03, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo

NÃOL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

. - کا نش^ر

_ .

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Curso de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Aplicação de método analítico para a caracterização dos polimorfismos de um único nucleotídio no gene do receptor de insulina em pacientes com síndrome de resistência insulínica grave e diabetes melito do tipo 2

Vladimir Tavares

Dissertação para obtenção do grau de . MESTRE

Orientador: Prof Dr Daniel Giannella Neto

São Paulo

1999

16017



///// NA

A destruction of the second se

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Tavares, Vladimir
T231a Aplicação de método analítico para a caracterização dos polimorfismos de um único nucleotídio no gene do receptor de insulina em pacientes com síndrome de resistência insulínica grave e diabetes melito do tipo 2 / Vladimir Tavares. ----São Paulo, 1999. 116p.
Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Giannella Neto, Daniel
1. Bioquímica elínica 2. Genética 3. Biologia molecular I. T. II. Giannella Neto, Daniel, orientador.

616.0756 CDD

VLADIMIR TAVARES

Aplicação de método analítico para a caracterização dos polimorfismos de um único nucleotídio no gene do receptor de insulina em pacientes com síndrome de resistência insulínica grave e diabetes melito do tipo 2

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO/TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Prof. Dr. Daniel Giannella Neto Orientador/Presidente

Prof^a. Dr^a. Regina Célia Mello Santiago Moisés 1º Examinador

Prof^a. Dr^a Sandra Mara Ferreira Villares 2º Examinador

São Paulo, 22 de dezembro de 1999

À Regina, por sua paciência, carinho e amor durante todos estes anos.

Aos meus filhos, Víctor e Viviane, que estão sempre em meu coração, dando-me forças para suportar os momentos mais difícies.

Ao **Prof. Dr. Daniel Giannella Neto,** pelo convívio, orientação segura e aprimorado rigor científico sempre presentes na realização deste trabalho.

-

Agradecimentos

Ao Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata, coordenador do curso de Pós-Graduação em Farmácia, área de Análises Clínicas da Universidade de São Paulo, pelo apoio e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Sandra M. Villares, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas sugestões e análise crítica deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Regina Célia Mello Santiago Moisés, do Departamento de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo, pela cessão de paciente.

Aos integrantes do Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas – Setor de Endocrinologia Molecular (LIM-25B), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: Maria Angela Henriques Zanella Fortes, Ana Mercedes de Souza Cavaleiro, Marco Antonio Rego, Norisa Herrera, Rosângela e Domingos, pela amizade e consideração.

À secretária do Departamento de Análises Clínicas: Márcia; e da Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Benedita, pelo auxílio profissional.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

O laboratório é respeitável. A academia é nobre. O templo é santo. A ciência convence. A filosofia estuda. A fé converte o homem ao Bem Infinito. *Emmanuel*

ÍNDICE

Página

Lista de abreviaturas2
1. Introdução4
1.1. Receptor de insulina: estrutura e função6
1.2. Fosforilação da tirosina na ação da insulina10
1.3. Resistência à insulina12
1.4. Síndromes de RI: características clínicas13
1.5. Defeitos moleculares dos receptores de insulina
2. Objetivos
3. Materiais e Métodos27
3.1. Casuística27
3.2. Materiais
3.3. Métodos31
4. Resultados42
5. Discussão
6. Conclusões
7. Resumo
8. Abstract
9. Referências bibliográficas90

Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
μg	microgramas
μL	microlitros
μM	micromolar
А	adenina
ATP	trifosfato de adenosina
BIP	proteína ligada a imunoglobulina de cadeia pesada
bp	pares de bases
cDNA	cadeia complementar de DNA
С	citosina
DM 2	diabetes melito do tipo 2
DNA	ácido desoxi-ribonucleico
dNTPs	deoxinucleotídios trifosfato
ddNTPs	dideoxinucleotídios trifosfato
EGF	fator de crescimento epidermal
EBV	vírus Epstein Barr
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	guanina
hINSR	receptor de insulina humano
Hb	hemoglobina
INSR	receptor insulínico
IGF-I	fator de crescimento insulina-símile tipo l
IR	insulino resistência
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
IVS	seqüências intervenientes
kb	kilobases
LDL	lipoproteínas de baixa densidade

Μ	molar
ng	nanograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PCR	reação de polimerização em cadeia
pmol	picomol
RI	resistência insulínica
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
SSCP	polimorfismo conformacional de fita simples
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNP	polimorfismo por um único nucleotídio
т	timina
TOTG	teste oral de tolerância a glicose
TE	tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N' tetrametilenodiamina
TBE	tris borato EDTA
Tris-HCI	tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UV	ultra -violeta
V	volts
W	watt

1.Introdução_____

A homeostase da glicose, no jejum, depende do balanço entre a sua produção pelo fígado e a utilização nos tecidos insulino-dependentes (muscular, adiposo e hepático) e insulino-independentes (cérebro e rins). Este balanço é regulado através de hormônios pancreáticos. Portanto, em indivíduos normais, um aumento na glicose plasmática é acompanhado por elevação na secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Este aumento de insulina circulante estimula o transporte da glicose para os tecidos periféricos, inibindo a neoglicogênese hepática e glicogenólise (TAKAYAMA et al., 1988). Em adição aos efeitos iniciais na homeostase da glicose, a insulina promove outros eventos na célula, tais como: regulação do transporte de íons ou amino-ácidos, ação no metabolismo de lípides e transcrição gênica.

Embora a resposta celular à insulina possa variar de acordo com a célula ou tecido, suas principais ações são mediadas pelo seu receptor específico (SEINO et al., 1990). A clonagem da cadeia complementar de DNA (cDNA) do receptor de insulina humano (EBINA et al., 1985; ULLRICH et al., 1985) e a caracterização da organização genômica do receptor (SEINO et al., 1989) permitiram a análise dos defeitos moleculares nas várias síndromes de resistência insulínica (TAYLOR et al., 1990; TAYLOR, 1991). Ressalta-se também o grande avanço no entendimento da via molecular da ação da insulina, qual seja, a observação de que a subunidade atividade tirosino-quinase. seu receptor possui sofrendo ß do autofosforilação, após estimulação pela insulina (KASUGA et al., 1982). Estudos posteriores puderam esclarecer os mecanismos envolvidos na ativação e regulação desta quinase (AVRUCH et al., 1982; KASUGA et al., 1982; PETRUZZELLI et al., 1982).

O termo resistência insulínica (RI) está relacionado às ações da insulina sobre a homeostase da glicose e é definido como a resposta biológica anormal para uma dada concentração de insulina (MOLLER ; FLIER, 1991). Altas doses de insulina não podem estar, entretanto, refletindo RI nas células-alvo, como pode-se observar nos raros casos de pacientes que necessitam de altas doses de insulina devido ao desenvolvimento de altos títulos de anticorpos anti-insulínicos ou nos casos de contraditória entidade clínica associada ao aumento da degradação local da insulina exógena.

A RI é uma importante característica do diabetes melito do tipo 2 (DM 2) (REAVEN, 1988). Neste tipo de diabetes existem, pelo menos, dois defeitos fundamentais: diminuição da capacidade dos tecidos periféricos em responder à insulina (insulino resistência) e função prejudicada das células β, resultando em hiperglicemia duradoura. Estudos realizados em populações com alta prevalência de DM 2, mostraram que o início da resistência à insulina antecede o diabetes (KNOWLER et al., 1990). A resistência insulínica representa, portanto, um excelente marcador para DM 2. Como a predisposição em desenvolver DM 2 é geneticamente determinada, faz-se necessário identificar os defeitos dos receptores insulínicos (INSR) associados a intolerância à glicose e RI. Nos últimos anos, descreveram-se muitos pacientes com doenças genéticas associadas `a RI e disfunção do INSR (KAHN et al., 1985; TAYLOR, 1987; TAYLOR, 1992; TAYLOR et al., 1994; ACCILI, 1995; JOSPE et al., 1996; KROOK; O'RAHILLY, 1996; ROUARD et al., 1997; TAKAHASHI et al., 1998).

A clonagem do cDNA do INSR (EBINA et al., 1985; ULRICH et al., 1985) e a determinação da organização genômica (SEINO et al., 1989) do gene do INSR, permitiram confirmar a hipótese de que muitos destes pacientes apresentam mutações gênicas. Seria também possível, entretanto, determinar se mutações do gene do INSR poderiam ser responsáveis pelo comprometimento menos grave da função do INSR em pacientes com as formas comuns de diabetes melito.

1.1. Receptor de insulina: estrutura e função

Sabe-se que após a secreção das células β pancreáticas, a insulina liga-se a receptores específicos de superfície celular, que estão presentes em praticamente todas as células de mamíferos (KAHN; WHITE, 1988). O número de receptores varia de apenas 40 por célula nos eritrócitos até 300.000 por célula nos adipócitos e hepatócitos (SEINO et al., 1990).

O receptor de insulina humano (hINSR) é codificado por um gene que está localizado na porção distal do braço curto do cromossomo 19 na região das bandas p13.2 \rightarrow 13.3 (YANG-FENG et al., 1985). Várias espécies de RNA mensageiro do gene do INSR são transcritos, sendo que há, no mínimo, três causas para esta heterogeneidade: 1^a) múltiplos sítios distintos de iniciação de transcrição, localizados entre 350-550 bp a montante do códon iniciador AUG (MAMULA et al., 1988; TEWARI et al., 1989; MCKEON et al., 1990); 2^a) existem, aproximadamente, cinco sinais de poliadenilação que são utilizados, os quais fornecem espécies de RNA mensageiro que variam em comprimento de 5-11 kb (TEWARI et al., 1989); 3^a) o exon 11 sofre montagem (*splicing*) variável (ULLRICH et al., 1985). O significado fisiológico desta heterogeneidade é desconhecido.

O INSR é processado pela remoção do peptídio de sinalização, glicosilação e clivagem em subunidades α e β , a partir de um precursor de 1.370 ou 1.382 amino-ácidos, incluindo 27 amino-ácidos correspondentes ao peptídio de sinalização, as quais são covalentemente unidas por ligações dissulfeto, para formar um heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (figura 1) (CZECH, 1985; EBINA et al., 1985; ULRICH et al., 1985; KAHN; WHITE, 1988; ROSEN, 1989). O receptor maduro é então transportado para a superfície celular onde é inserido na membrana plasmática. As subunidades α (719 ou 731 amino-ácidos) são totalmente extracelulares e contém o domínio de ligação da insulina, enquanto as subunidades β (620 amino-ácidos) são proteínas atividade tirosino-quinase à membrana que exibem ligadas

intracitoplasmática. A diferença de tamanho na subunidade α é conseqüente à montagem alternativa do exon 11, considerada tecido-específica, ontogeneticamente regulada e que codifica um segmento de 12 amino-ácidos na região carboxi-terminal desta subunidade (SEINO; BELL, 1989). O cérebro e baço expressam quase que exclusivamente a subunidade α com 719 amino-ácidos, enquanto a placenta, fígado, rins e tecido adiposo expressam subunidades α de 719 e 731 amino-ácidos (SEINO; BELL, 1989).

A subunidade α parece inibir a atividade tirosino-quinase da subunidade β , já que na sua ausência, a subunidade β é constitutivamente expressa. A ligação da insulina à subunidade α , provavelmente induz a alterações conformacionais no receptor que alivia esta repressão (SEINO et al., 1990). Então, após ligação da insulina, os receptores agregam-se e são rapidamente internalizados, podendo ser degradados ou reciclados para a superfície celular.

O gene do hINSR é composto por 22 exons e 21 introns (figura 2). Os exons variam de 36 bp (exon 11) a 2.500 bp (exon 22), enquanto os 21 introns variam de 500 a mais de 25.000 bp (SEINO et al., 1989).

A porção do gene do hINSR que codifica a subunidade α (exons 1-11) se expande a mais de 90.000 bp, enquanto os exons 12-22, que codificam a subunidade B, estão localizadas em conjunto na região de. aproximadamente, 30.000 bp (SEINO et al., 1990). Os exons 1-14 codificam a região extracelular do hINSR, enquanto os exons 16-22 codificam a região da proteína do receptor intracelular. Os exons 1, 2 e 3 (domínio N-terminal) são necessários para a afinidade da ligação, assim como, determinante primário para o reconhecimento da insulina, embora não esteja exatamente claro qual resíduo do receptor de insulina interage diretamente com a mesma (YIP, 1992).

Os exons 3, 4 e 5 codificam uma região rica em cisteína, em que a porção deste domínio, codificada pelo exon 3, é implicada na ligação com a insulina. Este domínio também está envolvido na ligação dissulfeto (α - α), unindo covalentemente os dois heterodímeros ($\alpha\beta$) (FRIAS et al., 1987;

XU et al., 1990; SCHAFFER et al., 1992). Devido a complexidade desta região, tem sido difícil identificar resíduos de cisteína específicos envolvidos na interação α-α.

A região codificada pelos exons 2 a 5 é homóloga à região que corresponde ao gene do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF) (SEINO et al., 1989). Os resíduos codificados pelo exon 6 parecem localizarse na interface entre subunidades α adjacentes, na forma heterotetramérica do hINSR. Neste exon, em pacientes com resistência insulínica grave, geralmente ocorre uma mutação Lys⁴⁶⁰→Glu. Estes receptores mutantes apresentam: aumento da afinidade na ligação com a insulina, aumento no índice de degradação e conseqüente diminuição nos níveis do receptor na superfície celular (RAFAELOFF et al., 1989; DE MEYTS et al., 1990; GUSTAFSON; RUTTER, 1990; KADOWAKI et al., 1990; TAYLOR et al., 1990).

O pequeno exon 11 compreende 36 bp que codificam a seqüência carboxi-terminal da subunidade α (SEINO et al., 1989). O exon 12 codifica a seqüência de amino-ácidos tetrabásicos Arg-Lys-Arg-Arg, local de clivagem para a enzima de processamento proteolítico gerador das subunidades $\alpha \in \beta$. Este exon também codifica a extremidade amino-terminal da subunidade β .

O exon 15 codifica a porção transmembranal da subunidade β . O exon 16 codifica um segmento que separa os domínios transmembranoso e tirosino-quinase. Os exons 17-21 codificam o domínio tirosino-quinase.

O exon 17 codifica os resíduos 1003-1008 (Gly-Gln-Gly-Ser-Phe-Gly) e 1030 (Lys) envolvidos na atividade quinásica através da ligação com o ATP. Os resíduos de tirosina que são fosforilados pela quinase quando da ligação com a insulina são codificados pelos exons 20 (Tyr 1158, 1162 e 1163) e 22 (Tyr 1328 e 1334). O exon 22 também codifica a extremidade carboxiterminal da subunidade β (SEINO et al., 1990).



BIBLIOTECA Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo

Figura 1: Representação esquemática do receptor de insulina (INSR). Observa-se a subunidade α com o domínio de ligação da insulina e ligação dissulfeto e subunidade β com os domínios justamembrana, quinase regulatório e fosforilação C-Terminal. Adaptado de TAYLOR et al., 1992.

1.2. Fosforilação da tirosina na ação da insulina

O receptor de insulina e de vários outros fatores de crescimento são tirosino-quinases ativadas pelos ligantes (KASUGA et al., 1982; ROSEN, 1987; KAHN; WHITE, 1988). Outros receptores de fatores de crescimento que exibem essa atividade, incluem os do fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento insulina-símile tipo I (IGF-I) e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (YARDEN; ULLRICH, 1988).

A ligação do hormônio às subunidades α do receptor de insulina heterotetramérico provoca rápida autofosforilação intramolecular de vários resíduos de tirosina nas subunidades β (WHITE et al., 1988). A fosforilação do receptor é autocatalítica e resulta em aumento significativo da atividade tirosino-quinase do receptor para outros substratos. Nas células intactas, o receptor de insulina é também fosforilado nos resíduos serina e treonina, inibindo a atividade tirosino-quinase do receptor insulínico (ROTH; BEAUDOIN, 1987; TAKAYAMA et al., 1988).

A atividade tirosino-quinase do receptor de insulina é necessária para a transdução do sinal. Uma mutação no receptor de insulina que modifique o sítio de ligação do ATP ou substitua os resíduos de tirosina em importantes sítios de autofosforilação, determina a perda completa ou a redução da atividade quinase estimulada pela insulina, com incapacidade de iniciar a resposta celular à insulina (ELLIS et al., 1986; CHOU et al., 1987).

Após a ativação quinase do receptor, ocorre a fosforilação de substratos proteicos celulares. O substrato endógeno considerado a mais importante proteína que contém fosfotirosina estimulada pela insulina é denominada substrato 1 do receptor insulínico (IRS-1) (SUN et al., 1991). Muitas das enzimas cujas atividades são moduladas a curto prazo pela insulina sofrem fosforilação ou desfosforilação nos resíduos de serina e/ou treonina (CZECH, 1985; ROSEN, 1987). Conseqüentemente, numerosas ações da insulina são mediadas por cascatas de reações de fosforilação e desfosforilação, que também são reguladas por outros hormônios.



Figura 2: Representação esquemática do gene do INSR com seus domínios funcionais. Com tamanho aproximado de 130 kb, apresenta 22 exons. A subunidade α é responsável, principalmente, pela ligação com a insulina e a subunidade β pela atividade tirosino-quinase do receptor. Adaptado de SEINO et al., 1990.

1.3. Resistência à insulina

O espectro clínico da RI é amplo e inclui pacientes com diabetes melito que requerem insulina e que continuam a ter hiperglicemia, apesar de altas doses de insulina exógena, assim como, aqueles que mantém níveis de glicemia próximo ao normal através de elevada secreção de insulina endógena.

Estas características de RI estão relacionadas ao diabetes melito do tipo 2 (DM 2) (PILLAY et al., 1996). Duas evidências dão suporte a esta conclusão. Primeiro, pacientes com DM 2 tem resposta diminuída à insulina exógena. Observa-se que grandes tecidos alvo são resistentes à ação biológica da insulina, por exemplo, a ação da insulina está prejudicada em sua capacidade de promover captação de glicose pelos músculos esqueléticos, inibir a produção de glicose pelo fígado e inibir a lipólise no tecido adiposo (REAVEN, 1988; DE FRONZO, 1992).

A segunda evidência baseia-se na observação de que pacientes com DM 2 são resistentes à ação da insulina endogenamente secretada. Hiperinsulinemia de jejum é uma anormalidade observada na história natural do DM 2 recente. Estudos tem demonstrado que pacientes são hiperinsulinemicos antes que a glicose no plasma tenha se tornado elevada a ponto de satisfazer o critério diagnóstico para o diabetes (WARRAM et al., 1990; MARTIN et al., 1992; LILLIOJA et al., 1993; BOGARDUS, 1993). Por exemplo, em pacientes com tolerância à glicose diminuída (são pacientes que tem risco aumentado de desenvolver DM 2 no futuro), os níveis de insulina plasmática estão elevados ao longo do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) (REAVEN et al., 1976). O fato de que a hiperinsulinemia não induz hipoglicemia, demonstra que o paciente é resistente a ação da insulina endógena produzida pelo pâncreas.

1.4. Síndromes de RI: características clínicas

As síndromes clínicas associadas à RI grave representam um modelo natural único para o estudo das mutações gênicas do hINSR associadas a desordens metabólicas *in vivo*. Os pacientes com RI são considerados uma fonte natural para o estudo dos mecanismos moleculares e bioquímicos de resistência insulínica.

Pacientes com RI manifestam as características clínicas da síndrome dos ovários policísticos, oligomenorréia e hirsutismo. Hiperinsulinemia pode ser responsável pelo acometimento da pele (acantose nigricante) e dos ovários devido à sua ligação tanto aos INSR, ainda competentes, como aos receptores do fator de crescimento insulina-símile tipo I (IGF-I). A ligação da insulina ou do IGF-I aos receptores de insulina ou de IGF-I presentes nos ovários estimula a esteroidogênese e o crescimento do tecido ovariano (hipertecose ou hiperplasia tecal) (BARBIERI et al., 1988; PORETSKY, 1991).

A acantose nigricante é caracterizada por papilomatose epidermal hiperqueratótica com aumento de melanócitos. As lesões hiperpigmentadas com aparência aveludada localizam-se predominantemente em locais de atrito constante, como as regiões de flexão (região cervical posterior, axilas e fossa anticubital). Uma vez que os pacientes com RI causada por anticorpos anti-receptores apresentam variações na expressão clínica da acantose nigricante em decorrência do grau de resistência à insulina, acredita-se que estas lesões sejam decorrentes dos efeitos tóxicos da hiperinsulinemia sobre a pele (KAHN et al., 1976; TAYLOR, 1985; TAYLOR, 1987).

O hiperandrogenismo é devido principalmente aos altos níveis de testosterona plasmática produzida em excesso pelos ovários da mulher na pré-menopausa com resistência insulínica grave (KAHN et al., 1976; TAYLOR, 1985; TAYLOR, 1987).

1.4.1. Síndrome de resistência insulínica do tipo A

A RI do tipo A é considerada o protótipo da síndrome grave de RI e é caracterizada por marcada hiperinsulinemia endógena com ou sem intolerância à glicose, acantose nigricante, hiperandrogenismo de origem ovariana na paciente na pré-menopausa (KAHN et al., 1976). A síndrome clássica é comumente manifestada em meninas adolescentes com amenorréia, hirsutismo e virilização devido ao hiperandrogenismo. Os ovários afetados podem apresentar hiperplasia estromal e hipertecose tal como é observado na mulher com a síndrome de ovários policísticos (BARBIERI et al., 1988; PORETSKY, 1991).

1.4.2. Variantes da síndrome do tipo A

As variantes da síndrome do tipo A caracterizam-se pela presença de achados clínicos da síndrome tipo A clássica somados as características clínicas específicas. Por exemplo, a síndrome de Rabson-Mendenhall caracteriza-se pela tríade de RI com diabetes melito, acantose nigricante e hiperandrogenismo associado ao dismorfismo de unhas e dentes e, como descrito originalmente, hiperplasia pineal (RABSON; MENDENHALL, 1956). Do ponto de vista clínico, esta síndrome parece ser intermediária, em relação a gravidade da doença, entre leprechaunismo e síndrome de resistência do tipo A. É difícil distinguir pacientes com leprechaunismo de pacientes com síndrome de Rabson-Mendenhall. A distinção mais evidente parece estar baseada no primeiro ano de vida. Se o paciente morre na infância, trata-se de leprechaunismo. (ELDERS et al., 1982; KADOWAKI et al., 1988; BARBETTI et al., 1992).

O leprechaunismo é uma síndrome congênita rara caracterizada por

retardo do crescimento intra-uterino, fácies dismórfica, acantose nigricante e RI grave (D'ERCOLE et al., 1979). As meninas acometidas por esta síndrome podem apresentar ovários policísticos, hirsutismo e clitoromegalia. Geralmente morrem no primeiro ano de vida. A observação de que alguns pacientes com leprechaunismo apresentam alterações em receptores de outros fatores de crescimento, tais como, EGF e IGF-I (REDDY; KAHN, 1989), sugere que certas mutações no receptor de insulina podem, indiretamente, comprometer a função dos receptores de outros fatores de crescimento (KADOWAKI et al., 1990), ou mesmo, atuar nos mecanismos de transdução comuns a eles.

Pacientes com lipoatrofia podem apresentar ausência generalizada do panículo adiposo, como na lipoatrofia congênita total (síndrome de Berardinelli-Seip), ou parcial, como na lipodistrofia parcial com lipoatrofia regional variável e hipertrofia do tecido adiposo em outras áreas. A lipoatrofia com RI pode estar associada, ainda, ao acromegaloidismo e dismorfismos (hipertrofia genital e cardiomiopatia) (MOLLER; FLIER, 1991).

1.4.3. Síndrome de resistência insulínica do tipo B

Além das síndromes genéticas acima descritas, a síndrome tipo B autoimune é causada pelo desenvolvimento de auto-anticorpos aos INSRs. A síndrome do tipo B de RI grave associa-se à acantose nigricante, diabetes de difícil controle e, na mulher na pré-menopausa, ao hiperandrogenismo ovariano. É mais comum na mulher que no homem. Estudos *in vitro* demonstram que os anticorpos anti-receptor podem mimetizar ou antagonizar a ação insulínica e, muitos pacientes com anticorpos anti-receptor, podem expressar, dependendo da progressão da doença, tanto RI como hipoglicemia de jejum (TAYLOR et al., 1991). Muitos pacientes com síndrome do tipo B apresentam evidências clínicas e laboratoriais de doenças sistêmicas autoimunes, tais como: lupus eritematoso sistêmico, cirrose biliar primária e outras (BLOISE et al., 1989; MOLER;FLIER, 1991).

1.4.4. Diabetes melito do tipo 2 (DM 2)

O DM 2 é caracterizado pela associação entre comprometimento da ação insulínica, isto é, resistência insulínica e um defeito na capacidade funcional da célula β em secretar insulina. A observação de alguns pacientes com mutações do INSR que apresentam tolerância a glicose normal ou discretamente alterada e que persistem por anos na vigência de hiperinsulinemia fala a favor da relação entre a RI e o DM 2. Nestes casos, a hiperinsulinemia observada é extrema e excede em muito aquela do DM 2 típico. A habilidade da RI comprometer a função da célula β, em indivíduos susceptíveis, poderia ser um fator crítico na patogênese do DM 2. A seqüência nucleotídica do INSR determinada em um pequeno número de pacientes com DM 2 apresentou-se normal. Dados atuais sugerem que mutações no INSR são esporádicas em pacientes com DM 2 típico associada à RI leve (O'RAHILLY et al., 1991).

1.5. Defeitos moleculares dos receptores de insulina

Os defeitos na função do INSR, classicamente, são divididos de acordo com seu fenótipo bioquímico, em analogia a mutações similares identificadas no gene do receptor de LDL (*low density lipoprotein*).

Algumas mutações interferem nos múltiplos passos da função do INSR, e, como tal, são classificadas. Assim sendo, as características bioquímicas dos INSRs expressos pelos pacientes com síndrome de RI severa, sugere que a síntese de um INSR anormal é a principal causa do quadro de RI nestes pacientes.

Foram descritos muitos pacientes apresentando mutações em um ou ambos os alelos do gene do INSR. Dentre as 22 mutações pontuais identificadas na subunidade α dos INSR, 17 foram classificadas como mutação de sentido (*missense*) e 5 como mutação de terminação da cadeia (*nonsense*). Das 26 mutações identificadas na subunidade β , 23 foram classificadas como *missense* e 3 como *nonsense* (Tabela 1). Três deleções foram identificadas na subunidade α e uma na subunidade β .

As mutações do gene do INSR, segundo TAYLOR, (1995), podem ser classificadas de acordo com o comprometimento da fase do ciclo de vida do receptor em (figuras 3 e 4):

1.5.1. Classe 1

Esta classe relaciona-se a mutações que reduzem a expressão do gene do INSR e, conseqüentemente, a biosíntese do receptor está qualitativa e quantitativamente comprometida. Destaca-se também que, esta classe de defeito compreende os heterozigotos compostos, ou seja, mutação *nonsense* em um dos alelos e mutação *missense* em outro alelo.

Existem, pelo menos, três tipos de defeitos moleculares que possivelmente explicam os mecanismos pelos quais estas mutações diminuem os níveis de RNA mensageiro: 1º) diminuição na transcrição do gene do INSR; 2º) montagem (*splicing*) anormal do RNA mensageiro do INSR; 3º) degradação acelerada do RNA mensageiro do INSR.

Em determinados pacientes ocorre acentuada diminuição nos níveis do RNA mensageiro do INSR, levando a redução da biosíntese (TAYLOR et al., 1982; OJAMAA et al., 1988; LONGO et al., 1992; KROOK et al., 1993). Da mesma forma, mutações *nonsense* associadas à diminuição dos níveis de RNA mensageiro do INSR foram identificadas em outros pacientes (KADOWAKI et al., 1990; KUSARI et al., 1991).

Deleções do gene do INSR também foram identificadas (SHIMADA et al., 1990; MATSUURA et al., 1991), sendo que em determinados casos, o

gene inteiro não era encontrado e, portanto, o RNA mensageiro não era transcrito (ACCILI, 1995). Assim, a perda dos receptores funcionais de insulina é compatível com o desenvolvimento embrionário e fetal, haja vista que nestes casos, os efeitos da insulina podem ser mediados por receptores cognatos e os resultados das deleções são variáveis que dependem de sua extensão e localização. Observa-se também que em determinadas situações, o RNA mensageiro é pobremente transcrito, enquanto que em outras circunstâncias uma proteína truncada é sintetizada (TAIRA et al., 1989; SUZUKI et al., 1992; JOSPE et al., 1993).

1.5.2. Classe 2

Este tipo de defeito está relacionado a mutações que prejudicam o transporte dos receptores para a superfície celular. A insulina liga-se a seu receptor localizado na membrana plasmática da célula-alvo a fim de provocar resposta biológica intracelular característica. Mutações no gene do INSR podem levar a um estado de resistência da célula às ações biológicas da insulina. Para que ocorra o transporte intracelular normal das proteínas de membrana, tais como o INSR, é necessário que a estrutura tridimensional resultante do dobramento da proteína seja realizado corretamente dentro do retículo endoplasmático rugoso ou, também, no aparelho de Golgi. As mutações que comprometem o dobramento normal do receptor por alterar o processamento pós-traducional podem afetar o transporte intracelular do receptor e reduzir seu número na superfície celular.



Figura 3: Representação esquemática do ciclo de vida do INSR. Cinco fases podem estar comprometidas por defeitos produzidos por mutações no gene do receptor de insulina.

Mutações na porção amino-terminal da subunidade α estão associadas ao processamento intracelular e transporte para a membrana plasmática (KOBAYASHI et al., 1988; KAKEHI et al., 1988; ACCILI et al., 1989; KLINKHAMER et al., 1989; KADOWAKI et al., 1990; MAASSEN et al., 1991; VAN DER VORM et al., 1992; BARBETTI et al., 1992; TAKATA et al., 1993; WERTHEIMER et al., 1994). Uma única mutação no domínio intracelular do receptor causa, entretanto, retardo no processamento e transporte (CAMA et al., 1993).

Estudos adicionais foram feitos com o objetivo de definir os mecanismos que prejudicam o transporte e processamento dos receptores mutantes através do retículo endoplasmático e Golgi. Estes estudos demonstraram que pró-receptores de insulina mutantes estão ligados a BIP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*) (ACCILI et al., 1992), uma proteína do retículo endoplasmático que se liga transitoriamente a novas proteínas sintetizadas, catalisando sua " dobradura" em uma conformação normal. Tem sido mostrado, com várias outras proteínas mutantes, que receptores mutantes não dissociam da BIP. Esta anormalidade prolonga a ligação e, desta forma, relacionando-se ao defeito no transporte da proteína através do retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

Provavelmente, os pró-receptores mutantes não adquiram conformação normal e, sendo assim, estão prejudicados em sua capacidade de dissociarse da BIP, não sendo transportado eficientemente do retículo endoplasmático para o Golgi e membrana plasmática (ACCILI et al., 1989; KADOWAKI et al., 1991).

As mutações desta classe são clinicamente recessivas, sendo que pacientes afetados são homozigotos ou heterozigotos compostos. A explicação provável para este achado pode estar no fato de que receptores mutantes estão prejudicados em sua capacidade de sofrer dimenzação, uma etapa inicial do processamento do receptor (KADOWAKI et al., 1991). Também é provável que em heterozigotos, somente receptores sintetizados do alelo normal sejam expressos na membrana plasmática. (LEVY-TOLEDANO et al., 1994).

1.5.3. Classe 3

A função do INSR pode ser avaliada através da capacidade do receptor em ligar-se à insulina. A ligação da insulina ao seu receptor pode estar comprometida pela diminuição tanto no número de sítios de ligação de insulina na superfície celular, como na afinidade destes sítios. Mutações pontuais foram descritas nos mais diferentes quadros clínicos (KADOWAKI et al., 1991; VAN DER VORM et al., 1992; AL-GAZALI et al., 1993 ; LONGO et al., 1993 ; HONE et al., 1994). A histidina localiza-se no domínio rico em cisteína (amino-ácidos 155-312) da subunidade α do INSR, região altamente conservada quando comparada com outros receptores, ou seja, existem 17 resíduos de cisteína conservados no domínio rico em cisteína tanto do INSR como em 10 outros tipos de receptores de outras espécies (KADOWAKI et al., 1990). A conservação da His²⁰⁹ sugere fortemente que desempenhe importante papel na manutenção da estrutura normal destes receptores.

A mutação pontual no INSR, caracterizada pelo comprometimento do processamento tetra-básico da molécula do pró-receptor, altera a seqüência Arg-Lys-Arg-Arg para Arg-Lys-Arg-Ser na posição 735 (ARG735SER) (SEINO et al., 1989; YOSHIMASA et al., 1990). Os linfoblastos transformados pelo Epstein-Barr Vírus (EBV) do paciente descrito com este tipo de mutação sintetizava um precursor do INSR que, embora sujeito à glicosilação normal e com ligação adequada à membrana plasmática, não sofria clivagem entre as subunidades α e β de sua proteína matura. A ligação com a insulina nestas células apresentava-se grandemente reduzida e, quando submetida à moderada digestão com tripsina, apresentava, concomitantemente, aumento de cinco vezes na sua capacidade de ligação com a insulina e aparecimento de subunidades a normais. Isto demonstra que a proteólise do pró-receptor é necessária para a ligação com a insulina e para a atividade na transdução do sinal. Uma protease celular mais específica que a tripsina é necessária para o processamento do precursor do INSR. YOSHIMASA et al., (1988) sugeriram que o mecanismo pelo qual a

clivagem do pró-receptor promove o aumento da ligação com a insulina poderia ser dependente de um ou mais dos seguintes fatores, agindo independentemente ou em combinação: (1) alteração conformacional comprometeria o sítio de ligação da insulina na subunidade α ; (2) auto-associação alterada nos receptores dentro de estruturas oligoméricas melhorando as características da ligação; (3) aumento da associação do receptor com outros componentes da superfície celular que normalmente regulam a afinidade do receptor (LANDER; BOTSTEIN, 1987).

1.5.4. Classe 4

Mutações no domínio intracelular da subunidade β podem prejudicar a autofosforilação do receptor e inibir a atividade quinase. Quando a insulina se liga ao seu receptor ocorre ativação da atividade tirosino-quinase. Existem evidências que fortalecem a hipótese de que a proteína-quinase tirosino-específica seja necessária para o INSR mediar a ação insulínica. Várias mutações foram descritas no domínio tirosino-quinase que inibem sua atividade (HANKS et al., 1988; ODAWARA et al., 1989; TAIRA et al., 1989; MOLLER et al., 1990; YOKOTA et al., 1990; TAYLOR et al., 1990; KUSARI et al., 1991; CAMA et al., 1991).

O INSR é composto pela estrutura $\alpha_2\beta_2$ e mutações nesta região podem originar a estrutura híbrida $\alpha_2\beta_{wt}\beta_{mut}$ em adição às outras formas simétricas $\alpha_2(\beta_{wt})_2 e \alpha_2(\beta_{mut})_2$. Parece que somente o receptor simétrico do tipo natural (*wild type*) $\alpha_2(\beta_{wt})_2$ apresenta atividade tirosino-quinase. Tanto os receptores do tipo híbrido, $\alpha_2\beta_{wt}\beta_{mut}$ e do tipo simétrico $\alpha_2(\beta_{mut})_2$ não apresentam atividade tirosino-quinase.

O efeito negativo dos receptores com atividade tirosino-quinase defeituosa é ilustrado em estudos com células transfectadas que expressam receptores de insulina mutantes. A insulina estimulou a incorporação de timidina em, aproximadamente, duas vezes nas linhagens de células NIH-3T3 não transfectadas e aproximadamente oito vezes em linhagens transfectadas com receptores naturais (CAMA et al., 1992).

A insulina não causou, portanto, estimulação detectável de incorporação de timidina em linhagens celulares transfectadas com receptores mutantes. Assim sendo, estes receptores exercem um efeito inibitório na habilidade dos receptores de insulina nas células NIH-3T3 em mediar a ação mitogênica da insulina.

1.5.5. Classe 5

Nesta classe estão as mutações que aceleram a degradação do receptor. A ligação da insulina com o seu receptor desencadeia o processo de internalização do hormônio-receptor através da endocitose. Os receptores internalizados estão localizados dentro dos endossomos com os sítios de ligação da insulina orientados para dentro da vesícula. O pH 5,5 (ácido) dentro dos endossomos, mantido por processo ativo através de bombas de prótons, promove a dissociação da insulina de seu receptor. Mutações, tais como, a Glu460 e Ser 462, comprometem o papel do pH ácido em liberar a insulina do seu receptor (KADOWAKI et al., 1990).

Após sua internalização, existem dois possíveis destinos para o receptor: reciclagem e retorno para a membrana plasmática e degradação dentro dos lisossomos. As mutações que dessensibilizam o receptor ao pH ácido, comprometem a reciclagem do receptor e, conseqüentemente, favorecem a degradação dos mesmos no lisossoma. O aumento da degradação do receptor leva à diminuição de seu número na superfície celular (KADOWAKI et al., 1990).

Embora não haja registro da descrição de defeitos na internalização do INSR, a possibilidade na sua ocorrência é corroborada pela observação de mutação no receptor do LDL associada à defeito de internalização (BROWN, GOLDSTEIN; 1986; HOBBS et al., 1990).

23



Figura 4: Mapa das mutações nonsense (interrupção prematura da cadeia), missense (substituição de base) e deleções no gene do INSR descritas até o momento. O número de resíduos corresponde aos descritos por EBINA et al., 1985.

Tabela 1: Relação das mutações do INSR descritas até o momento e classificadas de acordo com o códon acometido. Lepr.: leprechaum; RI: resistência insulínica; DM 2: diabetes melito do tipo 2; Term.: códon terminador. [Adaptado de informações obtidas do Online Mendelian Inheritance in Man (OMIN) e Human Gene Mutation Database, Cardiff (HGMD)]

códon	Nucleotídio	Resíduos	Q.Clínico	Refs.	códon	Nucleotídio	Residuos	Q.Cl(nico	Refs.
15	AACa-AAA	Asn-Lys	Lepr.	57	831	gACG-GCG	Thr-Ala	DM 2	65
28	GTC-GCC	Vai-Ala	Lepr.	12	897	gCGA-TGA	Arg-Term.	Lepr.	67
31	aGGA-AGA	Gly-Arg	Lepr.	152	910	ACG-ATG	Thr-Met	Lepr.	66
59	GAT-GGT	Asp-Gly	RI	115	985	cGTG-ATG	Val-Met	DM 2	102
62	CTG-CCG	Leu-Pro	RI	115	993	CGA-CAA	Arg-Gin	RI	59
86	CGA-CCA	Arg-Pro	Lepr.	80	1000	tCGA-TGA	Arg-Term	RI	68
86	aCGA-TGA	Arg-Term	RI	90	1008	GGC-GTC	Gly-Val	DM 2	104
119	ATCg-ATG	lle-Met	RI	44	1048	GCC-GAC	Ala-Asp	RI	45
121	gAAG-TAG	Lys-Term	Lepr.	58	1068	cAAG-GAG	Lys-Glu	DM 2	102
133	TGG-TAG	Trp-Term	RI	68	1092	gCGG-TGG	Arg-Trp	Lepr.	33
193	CCG-CTG	Pro-Leu	Lepr.	24	1131	CGG-CAG	Arg-Gin	RI	70
209	CAC-CGC	His-Arg	Lepr.	57	1134	gGCA-ACA	Ala-Thr	RI	89
233	CTG-CCG	Leu-Pro	RI	62	1135	GCG-GAG	Ala-Glu	RI	20
274	TGC-TAC	Cys-Tyr	Lepr.	155	1153	ATGa-ATA	Met-lle	RI	23
323	TCG-TTG	Ser-Leu	RI	64	1164	CGG-CAG	Arg-Gin	DM 2	27
366	aGGG-AGG	Gly-Arg	Lepr.	12	1174	CGG-CAG	Arg-Gin	Ri	92
372	cCGA-TGA	Arg-Term	RI	75	1174	aCGG-TGG	Arg-Trp	Lepr.	155
382	cTTC-GTC	Phe-Val	RI	4	1178	CCG-CTG	Pro-Leu	RI	71
412	TGG-TCG	Trp-Ser	Lepr.	143	1179	GAGt-GAC	Glu-Asp	RI	47
460	gAAG-GAG	Lys-Glu	Lepr.	56	1179	gGAG-AAG	Glu-Lys	Lepr.	33
462	AAT-AGT	Asn-Ser	RI	26	1193	TGG-TTG	Trp-Leu	RI	47
672	cCAG-TAG	GIn-Term.	Lepr.	56	1200	TGG-TCG	Trp-Ser	RI	93
735	AGGt-AGT	Arg-Ser	RI	166	1334	TAC-TGC	Tyr-Cys	DM 2	65
786	gCGA-TGA	Arg-Term	Lepr.	48	1351	CGG-CAG	Arg-Gln	RI	64

2. Objetivos_____

 Aplicar as técnicas de PCR-SSCP e seqüenciamento, na prospecção e caracterização de polimorfismos no gene do receptor de insulina (INSR) em pacientes com síndrome de resistência insulínica grave.

• Determinar a freqüência do polimorfismo de um único nucleotídio, utilizando-se a técnica de PCR alelo específico em um grupo de pacientes com diabetes melito do tipo 2 (DM 2) em comparação com indivíduos normais.

3.1. Casuística

Os pacientes estudados foram selecionados no Ambulatório da Equipe Médica de Diabetes, Serviço de Endocrinologia e Metabologia, Divisão Médica I do Hospital das Clínicas (FMUSP) e no Serviço de Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP). Todos os procedimentos clínicos e provas funcionais foram aprovadas pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas e o consentimento para a realização dos mesmos foi obtido, por escrito, dos pacientes ou de seus representantes legais. Nenhuma das pacientes fazia uso de qualquer antidiabético oral que pudesse mascarar o quadro de resistência insulínica quando da obtenção das amostras necessárias para a avaliação laboratorial.

3.1.1. Grupo A

Neste grupo A, foram analisados 7 pacientes que apresentaram quadro clínico característico de síndrome de resistência insulínica grave e um paciente com diabetes melito do tipo lipoatrófico.

As características antropométricas, bioquímicas e clínicas dos pacientes deste grupo, identificados por suas iniciais (DPS, LOM, ACS, MKR, QCS, MIS, MJS e EDR), estão resumidas na tabela 2. A genitora e irmã da paciente LOM e a irmã da paciente QCS foram estudadas com a finalidade de verificar a segregação do alelo polimórfico, entre os membros da família, sem o fenótipo característico de resistência insulínica do tipo A.

3.1.2. Grupo B

O grupo B era constituído de 27 indivíduos (7 masc. e 20 fem.), com

Ä
grupo
ဓ
clínico
Ð
bioquímicos
Tabela 2: Dados antropométricos,

															ANTICORPOS
PACIENTES	SEXO	IDADE	RAÇA	PESO	ALTURA	IMC	ACANTOSE	HIRSUTISMO	SOP	GLICEMIA	INSULINA	PEPTÍDIO C	HbA1c	TRATAMENTO	ANTI-RECEPTOR
		(soue)		(Kg)	(L)		NIGRICANTE			(mg/dL)	(JmVmL)	(Jm/gn)	E	CLÍNICO	DE INSULINA
1 - DPS	Ľ	28	negróide	93	1,65	Ŗ	Sin	Sim	Ë	86	498	,	6,6	ADO	
2-LOM	Ľ	21	negróide	20	1,55	3	Sim	Não	Sin	345	153	r	18	ADO	,
3 - ACS	Ľ	17	caucasóide	58	1,60	33	sin	Rin	ŝ	129	•	7,4	,	,	
4 - MKR	Ľ	31	mongolóide	26	1,48	52	Sim	Não	Não	412		·	13,9	ADO	
5 - QCS	Ľ	20	caucasóide	75	1,59	8	Não	Não	ы Е	78	136	3,8	7,0	•	,
6 - MIS	Ľ	37	caucasóide	62	1,67	ន	Sim	Sim	Sim	74	120	,	•	•	
7 - MJS	Ľ	39	caucasóide	55	1,62	2	Sim	Sim	Sim	125	8		9,7	N-70	
8 - EDR	u.	23	negróide	8	1,26	16	Sin	Não	Não	420	•	0,3		N-70	negativo

IMC: ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (kg/m²) SOP: SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS

ADO: ANTIDIABÉTICOS ORAIS N-70: INSULINA MISTA NPH, 70 U/d
mediana de idade (40 a 75 anos), de variada origem étnica, apresentando diabetes melito do tipo 2 (glicemia entre 205-447 mg/dł e hemoglobina glicada entre 8,1-21,7%).

3.1.3. Controle para o grupo A

O controle para o grupo A era constituído de um indivíduo branco, com idade de 37 anos, sexo masculino, sem história familiar de diabetes e com perfil glicêmico e insulina normais, segundo a OMS.

3.1.4. Grupo C

O grupo C era constituído de 63 indivíduos (30 masc. e 33 fem.), com idade entre 40 a 70 anos, de variada origem étnica, apresentando perfil glicêmico normal, segundo a OMS.

3.2. Materiais

3.2.1. Amostras biológicas

As amostras para as determinações bioquímicas foram obtidas após jejum de 12 h, utilizando um sistema de coleta a vácuo, em tubos sem e com anticoagulante (EDTA 1mg/mL sangue). Os soros obtidos das amostras foram separados e mantidos a -20°C até sua posterior utilização.

Os tubos contendo sangue total foram utilizados para determinação da hemoglobina glicada e extração de DNA conforme item 3.4.

3.2.2. Reagentes

Foram utilizados seguintes reagentes: Tris (hidroximetil) OS aminometano ultra puro, EDTA, solução de xilenocianol e azul de bromofenol 0,25%, glicerol, hidróxido de sódio, tampão TBE 5x, formaldeído 37% e brometo de etídeo da Sigma Chemical Co. (St. Louis, E.U.A.); cloreto de sódio e ácido acético glacial da MERCK S A. (Ind. Química, Rio de Janeiro); SDS, agarose ultra pura, TEMED e solução concentrada de acrilamida: bisacrilamida - 19:1 (40%) da Amresco (Solon, E.U.A.); proteinase K e solução de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) da Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, E.U.A.); etanol absoluto da Vetec (São Paulo); tampão de reação de amplificação 10x, marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp, formamida, perssulfato de amônio e Tag DNA polimerase da Pharmacia Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia); solução concentrada (2x) de MDE gel FMC BioProducts (Rockland, E.U.A.); nitrato de prata da Carlo Erba Div. Quím. (São Paulo); álcool isopropílico da Sicalab Prod. Quím. Ltda (São Paulo); $[\alpha^{32}P]dCTP - 10 mCi/mL e [\alpha^{33}P]ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP) -$ 450 μCi/mL da Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England); kit de purificação de produto de PCR da Wizard PCR Preps System Promega Corporation (Madison, E.U.A.); kit Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing e tampão tolerante ao glicerol 20x da Amersham Life Science (Cleveland, E.U.A.).

Os amplímeros foram sintetizados no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Celular - LIM/25 - da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.3. Métodos

3.3.1. Determinações metabólicas

As determinações metabólicas foram realizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.3.1.1. Determinação da glicemia e hemoglobina glicada

A concentração plasmática de glicose foi determinada em analisador automático, modelo Cobas Integra da Roche (Basel, Suiça), pelo método enzimático hexoquinase. Os reagentes utilizados foram produzidos pela Roche (Basel, Suiça).

A hemoglobina glicada foi determinada pelo método automatizado de captura iônica, utilizando-se reagentes e equipamento da Abbot Laboratories (Abbott IMX System. Santa Clara, E.U.A.).

3.3.1.2. Determinações de insulina e peptídio C

As concentrações séricas de insulina e peptídio C foram determinadas por conjunto de reagentes adquiridos comercialmente (CIS bio International, Gif-Sur-Yvette, França) pelo método radioimunoensaio. As dosagens foram realizadas no setor de Endocrinologia Molecular e Celular (LIM 25/HC-FMUSP).

3.3.1.3. Interpretação clínica dos valores de glicemia, hemoglobina glicada, insulina e peptídio C

Para a correta interpretação clínica dos valores de glicemia, insulina, peptídio C e hemoglobina glicada, utilizou-se os critérios recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS): glicemia: 70 a 110 mg/dl; insulina: < 20 μUI/mL ; peptídio C: < 4,0 ng/mL e hemoglobina glicada: 4,8 a 7,8 %.

3.3.1.4. Controle de qualidade

O acompanhamento da precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações séricas de glicose, foi realizada pela determinação concomitante de soros controle Normal e Patológico da ControlLab Ltda (Rio de Janeiro) e Roche (Basel, Suiça). Em relação as determinações de insulina e peptídio C, este controle foi realizado através de soros controle, conforme instruções do fabricante.

3.4. Extração do DNA genômico:

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina (Emory University - Atlanta – E.U.A.), obtidos em tubos Vacutainer© (Becton and Dickson) com EDTA (1 mg/mL sangue) como anticoagulante. Cinco mililitros de sangue total foram submetidos à lise celular, lavando-se quatro vezes com 14 mL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0) e centrifugados a 1.500 rpm por 5 min à 4°C (centrífuga refrigerada Hettich Zentrifugen, rotor 116) até que se obtivesse um precipitado celular esbranquiçado. Este precipitado foi incubado à 37°C,

durante uma noite (lise dos núcleos celulares), com 3 mL de tampão A (Solução Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 0,4 M), 200 µL de SDS 10% e 500 µL de solução de proteinase K (10 mg/mL). Após incubação foi adicionado 1 mL de solução de NaCl 5 M (remoção das proteínas), mantendo-se sob agitação constante durante 15 min até centrifugação a 2.500 rpm por 15 min à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e novamente centrifugado. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado, cuidadosamente por inversão, com 2 volumes (10 mL) de etanol absoluto à temperatura ambiente. O mesmo foi transferido para um tubo de Eppendorf de 1,5 mL e ressuspendido com 200 µL de água bidestilada autoclavada, permanecendo por uma noite, sob incubação à 37°C.

A concentração do DNA obtido foi determinada através de leitura espectrofotométrica (260/280) em espectrofotômetro GeneQuant II (Pharmacia Biotech. Uppsala, Suécia). Só foram utilizadas as preparações de DNA que obtiveram relação $A_{260}/A_{280} > 1,8$. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.5. Análise do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)

A análise de SSCP foi realizada através de reação de polimerização em cadeia (PCR) dos 22 diferentes exons com os amplímeros relacionados na tabela 3. A reação constituiu-se dos seguintes reagentes adicionados nesta ordem: 5,2 μ L de água bidestilada autoclavada; 1,0 μ L de tampão termofílico 10x (KCI 500 mM, Tris-HCI 100 mM e MgCl₂ 15 mM pH 9,0); 0,5 μ L dNTPs (200 μ M); 0,1 μ L [α^{32} P]-dCTP (10 mCi/mL); 1,0 μ L de cada um dos amplímeros (2 pmol/ μ L); 0,2 μ L Taq polimerase (5 U/ μ L) e 1,0 μ L de DNA genômico (100 ng/ μ L) de cada um dos pacientes estudados. O protocolo de amplificação foi realizado em termociclador (PTC-150 - MJ Research Inc. Watertown, E.U.A.) e compreendeu: 1 ciclo de incubação a 94°C por 5 min

(desnaturação inicial); 30 ciclos de incubação à 94°C por 1 min (desnaturação), 55°C por 1 min (hibridização) e 72°C por 1 min (extensão) e 1 ciclo de incubação à 72°C por 10 min (alongamento). A reação foi mantida à 4°C até sua análise por eletroforese.

Um microlitro do produto da PCR foi diluído com 9 μ L da solução de desnaturação (formamida 95%, NaOH 10 mM, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianólico 0,25%) e incubado à 94°C por 2 min. Os tubos, assim preparados, foram mantidos em gelo até que fossem submetidos a eletroforese.

A eletroforese foi realizada com a utilização de equipamento para seqüenciamento de DNA com dimensões de 38 x 50 cm e 0,4 mm de espessura com pente de aplicação de 49 poços (BioRad Sequi-Gen GT Sequencing Cell. Hercules, E.U.A.). Vinte e cinco mililitros da solução concentrada (2X) do gel para eletroforese, adquirida comercialmente (MDE© Gel. J.T. Baker Inc. Phillipsburg, E.U.A.), foi diluída em 6 mL de tampão TBE 10X (Tris-borato 0,9 M e EDTA 20 mM) e água bidestilada autoclavada em quantidade suficiente para 100 mL. A polimerização foi obtida com adição de 40 µL de N.N.N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 400 µL de perssulfato de amônio 10%, preparado no momento do uso. Três microlitros de cada reação, após a desnaturação, foram aplicados separadamente em cada um dos pocos do gel e submetidos a eletroforese sob corrente constante de 6 W por 14 h a temperatura ambiente. Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma folha de papel cromatográfico Whatman© 3 MM Chr e submetido a secagem à vácuo em secador de gel modelo Dryer EC 355 (EC Apparatus Corporation) à 80 °C durante 120 min. As bandas foram visualizadas após exposição, por uma noite, em filme para autorradiografia Kodak XAR (Rochester, E.U.A.).

Alternativamente, as bandas puderam ser visualizadas após coloração com prata (AINSWORTH et al., 1991) de acordo com o método descrito a seguir: o gel de poliacrilamida (MDE© Gel) foi cuidadosamente transferido para um recipiente e mantido durante 3 min em uma solução de etanol 10% e

ácido acético 0,5%. Após este período o gel foi, primeiramente, incubado por 20 min, em novo banho constituído por uma solução de nitrato de prata 0,2%, etanol 10% e ácido acético 0,5% e lavado duas vezes com água bidestilada autoclavada durante 2 min. A solução de revelação utilizada a seguir, durante 30 min, foi constituída por 100 mL de NaOH 3% e 0,1 mL de formaldeído 37%. A revelação da prata foi interrompida através de nova incubação, por 5 min, com uma solução de etanol 10% e ácido acético 0,5%. Como preservativo, foi utilizado banho com glicerol 10% durante 10 min. O gel, assim preservado, foi cuidadosamente transferido para um suporte inerte BIBLIOTECA Valversidade de Ciências Farmacêuticas Valversidade de São Paulo flexível e envolvido em filme plástico.

3.6. Amplificação do DNA genômico por PCR

A identificação de bandas deslocadas de fragmentos de DNA amplificados em relação ao controle normal, forneceu subsídios para que se realizasse o ciclo-sequenciamento direto do exon em questão. Inicialmente, o exon foi amplificado por PCR com os seguintes reagentes adicionados nesta ordem: 39,1 μL de água bidestilada autoclavada; 5,0 μL de tampão termofílico 10x (KCI 500 mM, Tris-HCI 100 mM e MgCl₂ 15 mM, pH 9,0); 2,5 μ L de dNTPs (200 μ M); 1,0 μ L de cada um dos amplímeros (10 pmol/ μ L); 0,4 μL Taq polimerase (5U/μL) e 1,0 μL de DNA genômico (100 ng/μL) de cada um dos pacientes estudados. O protocolo de amplificação foi realizado sob as mesmas condições da análise de SSCP descritas no item 3.5.

3.7. Avaliação dos produtos de amplificação

Os produtos da reação de amplificação foram avaliados em gel de agarose 3%. O gel foi preparado com agarose em tampão TBE (Tris-borato

35

0,09 M, e EDTA 2 mM pH 8,0), aquecida em forno de microondas durante 30 segundos para solubilização da agarose. Após esta etapa aguardou-se até o resfriamento parcial (aproximadamente 50°C) do gel para se adicionar o brometo de etídeo (0,5 mg/L). A seguir, depositou-se o gel em um sistema de eletroforese horizontal *BioRad* com dimensões de 7,0 x 10 cm e pente de aplicação com 12 poços. Após solidificação do gel, aplicou-se nove microlitros do produto de PCR diluído em 1 μ L de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol 30%) e 1 μ L do marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp, também diluído no tampão de amostra em 1:5. Aplicadas separadamente em cada um dos poços do gel, a separação eletroforética das amostras foi realizada a 100 V durante 45 min.

As bandas foram visualizadas no transiluminador de luz UV. O gel foi fotografado com o sistema fotográfico Mitsubishi P90 (Mitsubishi Electric Corporation. Japão) e sua documentação feita através do equipamento Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories. Hercules, E.U.A.).

3.8. Purificação do Produto de PCR (Wizard©Minicolumn)

Ao restante do produto de amplificação (41 µL), adicionou-se 100 µL do Tampão de purificação Direta e 1 mL de resina (Wizard PCR Preps System. Promega Corporation. Madison, E.U.A) agitando-se (vortex) durante 60 s. De acordo com o protocolo do fabricante, a reação foi transferida para uma coluna plástica (Wizard© Minicolumn) de 1 cm de altura e submetida a vácuo até a secagem. Posteriormente, a cada coluna foi adicionado 2 mL de álcool isopropílico 80% e novamente submetida a vácuo, sendo que após a secagem da coluna, manteve-se a mesma por mais 30 s no vácuo. As colunas assim preparadas, foram apoiadas em um tubo Eppendorf de 1,5 mL e centrifugadas a 10.000 rpm por 2 min. Em seguida, adicionou-se 50 µL de

água bidestilada autoclavada a cada coluna, sendo as mesmas transferidas para um novo tubo onde o DNA purificado, diluído em solução aquosa, foi recuperado após centrifugação a 10.000 rpm por 20 s. O DNA foi armazenado a –20°C até sua posterior utilização.

3.9. Seqüenciamento manual do DNA purificado

O seqüenciamento direto dos produtos de PCR purificados foi realizado através da utilização de conjunto de reagentes adquirido comercialmente (Thermo Sequenase Radiolabeled terminator cycle sequencing Kit, Amersham Life Science, Cleveland, E.U.A). Para cada següência, foram adicionados 2,0 µL de uma mistura de terminação (7,5 µM dATP, dCTP, dGTP e dTTP) em um tubo plástico, cônico e autoclavado de 0,2 mL (um tubo para cada terminação), sempre mantidos no gelo. A cada um destes tubos, foram adicionados 4,5 µL da mistura de reação (Reaction mixture) composta por: 5,0 µL de água bidestilada autoclavada, 1,0 µL do amplímero (2,0 pmol), 2,0 µL do tampão para ciclo-seqüenciamento (Tris-HCl 260 mM, pH 9,5 e MgCl₂ 65 mM), 10 µL do DNA amplificado e purificado (200 ng), conforme seção 3.8 e 2,0 µL de Thermo sequenase polymerase (4U/µL). Por último, a cada tubo, adicionou-se 0,5 μ L de [α^{33} P]ddNTP (450 μ Ci/mL), respectivamente. Os 4 tubos de reação foram submetidos aos seguintes ciclos de incubações, em termociclador (PTC-150 - MJ Research Inc. Watertown, E.U.A.): 95°C por 30 s (desnaturação), 60°C por 30 s (hibridização) e 72 °C por 60 s (extensão). Após incubação, foram adicionados 4 µL de solução de interrupção (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianólico 0,05%). Os tubos foram incubados a 70°C durante 10 min e, após leve agitação e centrifugação rápida, foram mantidos em gelo até a aplicação no gel.

 Tabela 3: Relação dos amplímeros e do tamanho dos fragmentos de DNA

 amplificados através da reação de polimerização em cadeia (PCR).

EXON	AMPLIMEROS 5'3'	AMPLIMEROS 3'-5'	FRAGMENTOS
1	CGCGCTCTGATCCGAGGAGA	AGGGTTCTCAGTCCACAAGC	236
2	CCCTGATCCTTCTGATGCAT	GCTTTCTAGAACAAGGCACGA	677
3	ACAGGAATTGGACAAAGCCAT	AGCAGAGACCTCACTCATAGCCAA	538
4	GCCTGAGATGTCTGAAGGAC	GCCACTGAACGACCATCCTA	362
5	CTCACCATGGAGAATCATGA	CTAATACACGAACTTCCTAG	276
6	AGGCACGTAGCACTGAACAA	TGTAATGCACTTGAATCATGCTG	433
7	GACCTCTGCCTTCTCACGGT	AAACGTAGCAAGCACAGAGC	299
8	CGGTCTTGTAAGGGTAACTG	GAATTCACATTCCCAAGACA	322
9	GCACACTGTTTCTCATGATG	AGAGGTGAAGCAAAGTGCAT	285
10	TGTTCAGCCGCAGAGACTTG	CGGTCCCTAAGTAATGACCT	327
11	GTGGTCTGTCTAATGAAGTT	GAATTGGTGAAGCATCTGCT	238
12	TGATGGTGATGGTGTCATCATA	TGTCCTTGGTCAGCCTTGATGT	379
13	GGATCTCATCCAAGAGTTAC	TACTAATAGCACAGTACCTG	322
14	TGGACACTCCCAGATGTGCA	ACCATGCTCAGTGCTAAGCA	276
15	GTGAACTTTGTTGGAAACACATTG	CCTATACCTATATCAAGGCTAG	237
16	CCTTTCTGCAGAGTCCCATGAG	CAATGGTGAAGGCAAAGGAAGC	248
17	CCAAGGATGCTGTGTAGATAAG	TCAGGAAAGCCAGCCCATGTC	317
18	CTGGTGAGTCGAATCACGGA	AGCGGGTGCTCCACCGAGTA	214
19	GATCCCAGTGCTGCTGAAACAC	ACGGCTCATTATAGACAACTTC	285
20	AGGTTAAGAGCGTGTGAACCT	GAATTCAAGCCCAGCGTCCAT	208
21	GTCTAAATGGCTTCTTTGTTACTA	TACCCTTTCAACGAACACCTC	291
22	GACTCACCCAGGACGTGTCCTTC	CTCCAGGTTCACAGTTAAATCC	510

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em equipamento para sequenciamento (BioRad Sequi-Gen GT Sequencing Cell. Hercules, E.U.A.) com dimensões de 38 x 50 cm e 0,4 mm de espessura. Quinze mililitros de solução concentrada de acrilamida:bis-acrilamida (19:1;p:p) a 40%, adquirida comercialmente (Amresco), foi diluída com 5 mL de tampão tolerante ao glicerol 20x (Tris-base 1,8 M, Taurine 0,6 M, EDTA 11 mM e quantidade suficiente de água bidestilada autoclavada para 1000 mL) e água bidestilada autoclavada em quantidade suficiente para 100 mL. A polimerização foi obtida com adição de 100 µL de N,N,N',Ntetrametiletilenodiamina (TEMED) e 1 mL de perssulfato de amônio a 10%, preparado no momento do uso. Três microlitros de cada uma das reações, após desnaturação, foram aplicados separadamente em cada um dos poços do gel e submetidos a eletroforese sob corrente constante de 100 W, suficiente para manter a temperatura do gel entre 45-55°C, durante o período de corrida. Terminada a eletroforese, o gel foi transferido para uma folha de papel cromatográfico Whatman© 3 mm Chr e seco sob vácuo a 80°C durante 120 min. As bandas foram visualizadas após exposição por uma noite em filme supersensível (KODAK XAR. Rochester, E.U.A.).

3.10. PCR alelo específico

Realizou-se a amplificação (PCR alelo específico) do exon 11 (INSR) em 27 pacientes acometidos por diabetes melito do tipo 2 (grupo B) e 63 indivíduos normais (grupo C), devido a presença de uma substituição C \rightarrow G (transversão), em região intrônica (IVS 11), entre os exons 11 e 12, em 3 pacientes submetidos ao presente estudo. Utilizou-se amplímeros com seqüência mutada ou *wild-type* (anti-sense) e amplímeros do exon 11 (sense), conforme tabela 4. Também foram utilizados amplímeros do exon 12 (INSR), de acordo com a tabela 2, como controle positivo interno da PCR. A reação foi constituída dos seguintes reagentes, adicionados nesta ordem: 37,1 μL de água bidestilada autoclavada; 5,0 μL de tampão termofílico 10x (KCI 500 mM, Tris-HCI 100 mM e MgCl₂ 15 mM, pH 9,0); 2,5 μL de dNTP(s) (200 μM); 1,0 μL de cada um dos amplímeros (10 pmol/μL); 0,4 μL Taq polimerase (5U/μL) e 1,0 μL de DNA genômico (100 ng/μL) de cada paciente estudado. O protocolo de amplificação foi realizado em termociclador (PTC-150, MJ Research Inc. Watertown, E.U.A.) e compreendeu: 1 ciclo de incubação a 94°C por 5 min (desnaturação inicial); 30 ciclos de incubações a 94°C por 1 min (desnaturação), 59°C por 1 min (hibridização) e 72°C por 1 min (extensão) e 1 ciclo de incubação a 72°C por 10 min (alongamento). A reação foi mantida à 4°C até sua análise por eletroforese em gel de agarose a 3%, conforme seção 3.7 e figura 33.

Tabela 4: Relação dos amplímeros e do tamanho dos fragmentos de DNA amplificados pela reação de polimerização em cadeia (PCR alelo específico). Os amplímeros para a região IVS 11, amplificaram para um alelo normal e os da região IVS 11* para um alelo mutado.

REGIÃO	AMPLIMERO (SENSE)	AMPLÍMERO (ANTISENSE)	FRAGMENTO
IVS 11	5'CAGAGCCCAGTGGTCTGTTCT3'	5'CGCCGCATGCAAAAAGCCAG3'	212
IVS 11*	5'CAGAGCCCAGTGGTCTGTTCT3'	5'CGCCGCATGCAAAAAGCCAC3'	212

4.1. Análise do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)

Os resultados obtidos pela técnica de PCR-SSCP (rastreamento), encontram-se nas figuras 5 a 19. Apresentaram alteração de mobilidade eletroforética: paciente DPS (figura 8 - exon 7 e figura 9 - exon 16); paciente LOM (figura 9 - exon 11); paciente MKR (figura 12 - exon 11); paciente EDR (figura 15 - exon 11 e figura 16 - exon 19); familiar JOM (figura 17 - exon 9 e figura 18 - exon 12); paciente QCS (figura 18 - exons 11 e 17) e paciente MIS (figura 19 - exon 17). Pode-se observar exons que apresentaram padrões eletroforéticos polimórficos como nos exons 9 (figura 8), 10 (figura 18) e 19 (figura 19).

Dos casos analisados, em relação a freqüência de alteração de mobilidade eletroforética, obteve-se os seguintes resultados: exon 7, 1:8 pacientes; exon 9, 1:3 familiares de 2 pacientes; exon 11, 4:8 pacientes; exon 12, 1:3 familiares de 2 pacientes; exon 16, 1:8 pacientes; exon 17, 1:8 pacientes e 1:3 familiares de 2 pacientes e exon 19, 1:8 pacientes (Tabela 5).

4.2. Ciclo-seqüenciamento manual do DNA genômico

Os fragmentos relativos aos exons que apresentaram alteração de mobilidade eletroforética, no estudo de rastreamento através da técnica de PCR-SSCP, foram seqüenciados em ambas as direções (5' \rightarrow 3' e 3' \rightarrow 5'), por amplímeros que flanquearam estes exons. Os resultados obtidos através do ciclo-seqüenciamento manual do DNA genômico, para o receptor de insulina, encontram-se nas figuras 21, 23, 25, 27, 29 e 31.

Tabela 5: Mobilidade eletroforética alterada, encontradas no presenteestudo, por exon, pela técnica de PCR-SSCP.

EXON	Nº DE CASOS ANALISADOS		MOB. ELET	MOB. ELET. ALTERADA	
	PACIENTES	FAMILIARES	PACIENTES	FAMILIARES	
7	8	3	1:8	**	
9	8	3	**	1:3	
11	8	3	4:8	**	
12	8	3	**	1:3	
16	8	3	1:8	**	
17	8	3	1:8	1:3	
19	8	3	1:8	**	

** Sem Alteração



44

Figura 5 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 1 a 9 do INSR. As colunas 1 e 2 indicam o resultado das pacientes ACS e MJS com IR e a coluna 3 o controle normal.



Figura 6 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 10 a 18 do INSR. As colunas 1 e 2 indicam o resultado das pacientes ACS e MJS com IR e a coluna 3 o controle normal.



EXON 19



EXON 20



EXON 21



EXON 22

Figura 7 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 19 a 22 do INSR. As colunas 1 e 2 indicam o resultado das pacientes ACS e MJS com IR e a coluna 3 o controle normal.



Figura 8 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 1 a 9 do INSR. As colunas 1 e 2 indicam o resultado das pacientes DPS e LOM com IR e a coluna 3 o controle normal. Observa-se a presença de mobilidade eletroforética alterada referente ao exon 7 na coluna 1 (paciente DPS).



Figura 9 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 10 a 18 do INSR. As colunas 1 e 2 indicam o resultado das pacientes DPS e LOM com IR e a coluna 3 o controle normal. Observa-se a presença de mobilidade eletroforética alterada referente ao exon 11 na coluna 2 (paciente LOM) e exon 16 na coluna 1 (paciente DPS).



EXON 19



EXON 20



EXON 21





EXON 22

Figura 10 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 19 a 22 do INSR. As colunas 1 e 2 indicam o resultado das pacientes DPS e LOM com IR e a coluna 3 o controle normal.

EXON 7

EXON 8



EXON 9

Figura 11 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 1 a 9 do INSR. A coluna 1 indica o resultado da paciente MKR com IR e a coluna 2 o controle normal.



Figura 12 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 10 a 18 do INSR. A coluna 1 indica o resultado da paciente MKR com IR e a coluna 2 o controle normal. Observa-se a presença de mobilidade eletroforética alterada referente ao exon 11 na coluna 1 (paciente MKR).

51

2 1



EXON 19



2

1

EXON 20



2

1

EXON 21



EXON 22

Figura 13 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 19 a 22 do INSR. A coluna 1 indica o resultado da paciente MKR com IR e a coluna 2 o controle normal.



Figura 14 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 1 a 9 do INSR. A coluna 1 indica o resultado da paciente EDR com IR e a coluna 2 o controle normal.



Figura 15 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 10 a 18 do INSR. A coluna 1 indica o resultado da paciente EDR com IR e a coluna 2 o controle normal. Observa-se a presença de mobilidade eletroforética alterada referente ao exon 11 na coluna 1 (paciente EDR).



EXON 19



EXON 20



EXON 21



EXON 22

Figura 16 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 19 a 22 do INSR. A coluna 1 indica o resultado da paciente EDR com IR e a coluna 2 o controle normal. Observa-se a presença de mobilidade eletroforética alterada referente ao exon 19 na coluna 1 (paciente EDR).



Figura 17 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 1 a 9 do INSR. As colunas 1 a 5 indicam o resultado das pacientes CSS, JOM, MIS, OJO e QCS, respectivamente, com IR e a coluna 6 o controle normal. Observa-se a presença de mobilidade eletroforética alterada referente ao exon 9 na coluna 2 (paciente JOM).



Figura 18 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 10 a 18 do INSR. As colunas 1 a 5 indicam o resultado das pacientes CSS, JOM, MIS, OJO e QCS, respectivamente, com IR e a coluna 6 o controle normal. Observa-se a presença de mobilidade eletroforética alterada referente ao exon 11 na coluna 5 (paciente QCS), exon 12 na coluna 2 (paciente JOM) e exon 17 na coluna 5 paciente (QCS).





EXON 22





EXON 17

Figura 19 : Autorradiograma obtido pela técnica de PCR-SSCP para o rastreamento de mutações nos exons 6, 17 e 19 a 22 do INSR. As colunas 1 a 5 (exons 19 a 22) indicam o resultado das pacientes CSS, JOM, MIS, OJO e QCS, respectivamente, a coluna 1 a paciente OJO e MIS (exons 6 e 17), todos com RI e as colunas 6 (exons 19 a 22) e 2 (exons 6 e 17) o controle normal. Observa-se a presença de mobilidade eletroforética alterada referente ao exon 17 na coluna 1 (paciente MIS).

A figura 21 mostra o seqüenciamento do exon 7 do INSR da paciente DPS. Observa-se as trocas de bases $C \rightarrow T$ (transição) e, após 4 nucleotídios a transversão A \rightarrow C. Como apresentado na representação esquemática da figura 22, ambas as mutações ocorreram na região correspondente às porções 5.885 e 5.890, respectivamente, no intron 7. Nesta mesma paciente, o seqüenciamento do exon 16 (figura 23), evidenciou a substituição T \rightarrow C (transição) na região correspondente à posição 10.283 do intron 15, a montante do exon 16. De acordo com a figura 24, esta polimorfismo ocorreu a 14 nucleotídios antes do início do exon 16.

No seqüenciamento do fragmento correspondente ao exon 11, das pacientes LOM, MKR e EDR (figura 25), observa-se a substituição C \rightarrow G (transversão). A representação esquemática da figura 26, mostra que esta mutação ocorreu a 90 nucleotídios (nucleotídio 7.758) após o final do exon 11.

As figuras 27, 29 e 31 mostram o seqüenciamento do exon 9 da paciente JOM. Nota-se as trocas de bases $C \rightarrow T$ (transição), $A \rightarrow C$ (transversão) e $C \rightarrow T$ (transição) nas posições 6.674, 6.688 e 6.763, respectivamente. Nas representações esquemáticas das figuras 28, 30 e 32, verifica-se que estas mutações silentes ocorreram, respectivamente, a 57, 70 e 145 nucleotídios, após o início do referido exon.

Observando-se os resultados apresentados pelas duas técnicas (PCR-SSCP e seqüenciamento) no presente estudo, obteve-se confirmação no seqüenciamento em 6:11 dos exons com alteração de mobilidade eletroforética no PCR-SSCP e, ao contrário, 5:11 não foram confirmados pelo seqüenciamento (figura 20). BIBLIOTECA Faculdade de Ciências Farmacêuyuês Universidade de São Paulo

Alteração de mobilidade eletroforética no PCR-SSCP e confirmado com seqüenciamento

Alteração de mobilidade eletroforética no PCR-SSCP e não confirmado com seqüenciamento



Figura 20: Representação das alterações encontradas no gene do INSR, por PCR-SSCP e confirmadas ou não com o seqüenciamento.



Figura 21 : Autorradiograma representativo da análise de seqüência do intron 7 do INSR da paciente DPS. (A) Utilizando-se o amplímero sense e (B) o amplímero antisense. Observa-se as substituições A > C e de C > T, em heterozigose, na região intrônica entre os exons 7 e 8.

61



Figura 22: Representação esquemática das substituições C \rightarrow T e A \rightarrow C. Estão localizadas, respectivamente, 23 e 27 bp após a região de *splicing* entre os exons 7 e 8 do INSR da paciente DPS.



Figura 23 : Autorradiograma representativo da análise de seqüência do intron 15 do INSR da paciente DPS. (A) Utilizando-se o amplímero sense e (B) o amplímero antisense. Observa-se a substituição T C, em heterozigose, na região intrônica entre os exons 15 e 16.

63



Figura 24: Representação esquemática da substituição T \rightarrow C. Está localizada a 14 bp precedente à região de *splicing* entre os exons 15 e 16 do INSR da paciente DPS.


-		7668	<u>3</u>			. <u>7758</u>	Wild type
5'GAC	ССТ	AGg t	at gac	tca	<u>ee 4</u>	C (@)	(•(C)
Asp	Pro	Ar(g)					
727	728	729					
							mutante
: 5'GAC	CCT	AGg t	at gac	tca	ggtt	ic tgt (ggc3'
Asp	Pro	Ar(g)					
727	728	729					
:	•••••						
Exo	n 11						

Figura 26: Representação esquemática da substituição C \rightarrow G. Está localizada a 90 bp após a região de *splicing* entre os exons 11 e 12 do INSR das pacientes LOM, MKR e EDR.



na região do exon 9.



Figura 28: Representação esquemática da substituição C→T. Está localizada no exon 9 do INSR a 57 bp após a região de *splicing*. Refere-se a paciente LOM.





Figura 30: Representação esquemática da substituição A→C. Está localizada no exon 9 do INSR a 70 bp após a região de *splicing*. Refere-se a paciente JOM.





Figura 32: Representação esquemática da substituição C \rightarrow T. Está localizada no exon 9 do INSR a 145 bp após a região de *splicing*. Refere-se a paciente JOM.

4.3. PCR alelo específico

Na técnica da PCR alelo específico foram gerados amplímeros que puderam caracterizar o polimorfismo (IVS 11) em dois grupos estudados (grupos B e C). No grupo B, formado por 27 pacientes com diabetes melito do tipo 2 (DM 2), após a reação de polimerização em cadeia com os amplímeros adequados, obteve-se os seguintes resultados: 01 homozigoto (genótipo M/M), 10 heterozigotos (genótipos M/N) e 16 pacientes que não apresentaram o respectivo polimorfismo (genótipo N/N).

Para o grupo C, composto por 63 indivíduos apresentando níveis glicêmicos normais, os resultados foram os seguintes: 8 homozigotos (genótipo M/M), 21 heterozigotos (genótipo M/N) e 34 indivíduos sem o polimorfismo (genótipo N/N).

Esta metodologia também foi aplicada ao grupo A, constituído de 8 pacientes com resistência insulínica, em que obteve-se o seguinte: 3 heterozigotos (genótipo M/N) e 5 pacientes sem polimorfismo (N/N).

A freqüência dos genótipos e alelos para o polimorfismo IVS 11 do gene do receptor de insulina dos grupos estudados estão apresentados na tabela 6. Utilizou-se o teste do Qui-quadrado (X²) para avaliar as freqüências observadas e esperadas dos genótipos para cada grupo, obtendo-se $F_{crit} = 9,21$ (*P*<0,01), portanto, estatisticamente significante e de acordo com a Lei de Hardy-Weinberg.

Pela análise da PCR alelo específico, determinou-se que as freqüências dos alelos com polimorfismo foram 0,19, 0,22 e 0,29, respectivamente, nos grupos com resistência insulínica do tipo A, diabetes melito do tipo 2 e indivíduos normais. Utilizando-se o teste exato de Fisher, em relação às freqüências para os três grupos estudados, não foi possível obter qualquer diferença estatisticamente significante (P=0,61).

Em relação a figura 33, observa-se os padrões eletroforéticos determinados em gel de agarose (seção 3.7) e que foram obtidos por ocasião da caracterização de cada indivíduo pertencente aos grupos descritos. Para

cada paciente foram realizadas duas reações de PCR, em tubos distintos, sendo que no primeiro tubo foram colocados amplímeros que geraram somente bandas relativas ao polimorfismo procurado e, no segundo tubo, apenas os amplímeros para o alelo normal (fragmentos de 212 bp). Também foram adicionados a cada tubo, amplímeros do exon 12 do INSR, como controle positivo interno da PCR (fragmentos de 379 bp). Desta forma, na presença do polimorfismo, em homozigose, verificou-se apenas o aparecimento da banda relativa aos amplímeros específicos para a alteração (genótipo M/M). Em heterozigotos ocorreu a presença de duas bandas, tanto para o alelo polimórfico quanto para o normal (genótipo M/N). Finalmente, a presença de uma única banda correspondente aos amplímeros para o alelo normal (genótipo N/N), tem-se a ausência do polimorfismo e, portanto, indivíduos normais.



Figura 33: Eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de PCR alelo específico da mutação IVS 11 do INSR (bandas com 212 bp). A coluna 1 refere-se ao branco da reação, as colunas 2 e 3 correspondem ao indivíduo homozigoto, 4 e 5 heterozigoto, 6 e 7 ao indivíduo normal, 8 e 9 ao controle positivo e 10 e 11 ao controle negativo. O marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp refere-se à coluna 12. As bandas correspondentes aos fragmentos de 379 bp, relacionam-se ao exon 12 do INSR e indicam o controle interno positivo da PCR.

Tabela 6: Freqüência dos alelos normais (N) e polimórficos (M) calculadapara os três grupos estudados.

Grupos	Freqü	ência de ger	nótipos	Freqüênc	Teste do	
	MM	NN	MN	M	N	X ²
A	-	0,63 (5)	0,37 (3)	0,19	0,81	S
В	0,04 (1)	0,59 (16)	0,37 (10)	0,22	0,78	S
с	0,13 (8)	0,54 (34)	0,33 (21)	0,29	0,71	S
Número de ind	livíduos em par	ênteses	F _{crit} = 9,21 (<i>P</i> <0,01)			

5. Discussão_

Atualmente, tendo em vista o rápido crescimento na identificação de novas doenças genéticas, tem aumentado o interesse na caracterização de mutações responsáveis por esses acometimentos, ou ainda, a identificação de polimorfismos no DNA. Desta forma, crescem as expectativas em relação às pesquisas de novas seqüências variantes no genoma humano e a identificação de genes que conferem suscetibilidade ou resistência a determinadas doenças humanas. Neste sentido, a descoberta de polimorfismos no DNA será extremamente importante, sendo possível o estudo das variações genéticas, assim como, sua relação ou não com doenças e, conseqüentemente, melhora na eficácia de drogas e outras terapias. Este trabalho, porém, tem sido muito difícil, uma vez que, para a localização de genes que contribuem para o risco de doenças comuns, tais como o diabetes, doenças cardíacas e neoplasias, tem-se a ação de múltiplos genes que interferem nestes fenótipos, tendo cada qual um pequeno efeito que também está associado a fatores ambientais.

Sabe-se que grande parte das seqüências variantes no genoma humano é causada por uma única alteração de nucleotídio, sendo, por isso, denominados de polimorfismos por um único nucleotídio (SNP), pois são os tipos mais freqüentes de variação no genoma humano, fornecendo poderosa ferramenta para uma variedade de estudos genéticos. (WANG et al., 1998; TAILLON-MILLER et al., 1999)

Os SNPs em região codificadora de genes são as mais prováveis causas de diferenças funcionais do que sua localização em outro local. Embora muitos SNP(s) não afetem a função do gene, o seu mapeamento será de grande utilidade, pois fornecerá subsídios para que se possa conhecer os que realmente tem capacidade de marcar regiões de genes envolvidos em doenças (BROOKES, 1999; KEIGHTLEY et al., 1999). Desta forma, é crescente o interesse na pesquisa dos SNPs, inclusive com

melhoria de tecnologia a fim de poder identificá-los mais facilmente (HELLER et al., 1998), pois são mais numerosos e mais estáveis do que os microssatélites utilizados no mapeamento de genes(COLLINS et al., 1998). Assim sendo, um método que detecte mutações ou polimorfismos deve ser capaz de revelar uma única substituição de base.

Com o advento da técnica da reação de polimerização em cadeia (SAIKI et al., 1988), novas metodologias foram surgindo com a finalidade de identificar mutações e polimorfismos de maneira rápida e sensível. Inicialmente, polimorfismos em següências nucleotídicas puderam ser detectados pela clivagem do DNA genômico com endonucleases de restrição (mapas de restrição por análise de polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição - RFLP), revelando a localização no cromossomo de elementos genéticos envolvidos em doenças hereditárias (GUSELLA et al., 1983; REEDERS et al., 1985; KNOWLTON et al., 1985; TANZI et al., 1987 e MONACO et al., 1987). No entanto, com a utilização deste método em loci específicos de cromossomos de células cancerosas de tecido humano, como o carcinoma coloretal (SOLOMON et al., 1987), tumor de Wilms e certas neoplasias endócrinas (LARSSON et al., 1988 e MATHEW et al., 1987), verificou-se a perda da heterozigose nesses loci, sugerindo o envolvimento de mutações recessivas em genes específicos no desenvolvimento desses tipos de neoplasias. Um outro fator importante em relação a esta técnica é a utilização de uma enzima de restrição que seja capaz de reconhecer a seqüência de interesse, o que riem sempre é possível.

Posteriormente, com o objetivo de se obter maior eficiência no estudo do DNA geriômico, NOLL e COLLINS, (1987), utilizaram um método mais simplificado, baseado na eletroforese em gradiente de gel desnaturante que já havia sido desenvolvido anteriormente (MYERS et al., 1985). Em 1988, mutações em vários pacientes de rastrear uma técnica capaz simultaneamente foi elaborada, baseada no princípio de que fragmentos de DNA genômico (fita simples), obtidos por PCR, quando submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (não desnaturante), possuem diferenças de mobilidade, resultantes das alterações conformacionais dadas não somente pelo seu tamanho mas também por sua seqüência (ORITA et al., 1989a,b). A vantagem desta metodologia está no fato de que não são utilizadas enzimas de restrição, *blotting* ou hibridização com sondas, tornando-se desta forma, uma técnica com razoável facilidade de aplicação. Sua utilização foi difundida, a partir de então, na pesquisa de várias mutações em doenças humanas (MASHIYAMA et al., 1990; DEMERS et al., 1990; DEAN et al., 1990; AINSWORTH et al., 1991; MICHAUD et al., 1992; PAN et al., 1992 e TAKAHASHI et al., 1998).

Anteriormente a estes estudos, nas décadas de 1960 e 1970, muitos investigadores esforçavam-se em desenvolver métodos para 0 seqüenciamento dos ácidos nucleicos. Somente em 1977, duas diferentes mas efetivas técnicas de següenciamento de DNA puderam ser implantadas. Conhecidas como método de terminação de cadeia (SANGER et al., 1977) e método da degradação química (MAXAM e GILBERT, 1977), o primeiro, enzimático, baseia-se no princípio de incorporar nucleotídios modificados (dideoxinucleotídios) quando da polimerização de uma fita simples de DNA. A reação é interrompida quando este nucleotídio modificado é incorporado à fita, gerando famílias de fragmentos (A, C, G e T) que são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Como radiativamente são marcados (amplimeros esses fragmentos ou dideoxinucleotídios), um filme é sensibilizado, permitindo a leitura da següência a ser determinada. É um método de ótima sensibilidade, praticidade e que, atualmente, com o desenvolvimento de enzimas recombinantes, tem-se uma opção excelente na caracterização de mutações e polimorfismos no DNA genômico, contribuindo sobremaneira na elucidação das doenças genéticas.

O segundo método, o da degradação química, igualmente gera famílias de moléculas (A, C, G e T), que são produzidas, não pela síntese de novas cadeias mas pela quebra, através de substâncias químicas específicas, das cadeias iniciais.

Neste contexto, utilizando-se de uma metodologia de rastreamento de mutações e polimorfismos, com praticidade e sensibilidade adequadas, a

técnica de PCR-SSCP foi otimizada, visando sua utilização no rastreamento do gene do receptor de insulina (INSR). No presente estudo, portanto, foi possível caracterizar molecularmente polimorfismos no gene do receptor de insulina em quatro pacientes com síndrome de resistência insulínica grave e em um familiar destes pacientes. Todos os exons que apresentaram alteração de mobilidade eletroforética no SSCP, foram seqüenciados pelo método enzimático da terminação de cadeia (SANGER et al., 1977), conforme seção 3.9.

As pacientes selecionadas para este estudo estão relacionadas na tabela 2. A paciente MJS, com diagnóstico de diabetes melito do tipo lipoatrófico, apresentava como características comuns a resistência insulínica e intolerância a glicose. Em relação a paciente ACS, embora não tenha sido quantificada a insulina, verifica-se que apresenta níveis de peptídio C excedendo os limites normais.

Utilizando-se das técnicas de PCR-SSCP e seqüenciamento, foi possível detectar alguns polimorfismos, em região intrônica, como os observados em relação às pacientes DPS, LOM, MKR e EDR. A paciente DPS apresentou alteração de mobilidade eletroforética (SSCP) para os exons 7 e 16, conforme figuras 8 e 9, sendo confirmadas com o seqüenciamento nas figuras 21 e 23. Nota-se que são dois polimorfismos contíguos no intron 7 (5885C/T e 5890A/C) e um polimorfismo no intron 15 (10283C/T). Alteração de mobilidade eletroforética (SSCP), também foram encontradas em relação às pacientes LOM (exon 11 - figura 9), MKR (exon 11 - figura 12) e EDR (exon 11 - figura 15), confirmado com o seqüenciamento na figura 25 (pacientes LOM, MKR e EDR). Verificou-se que apresentaram idêntico polimorfismo (7758C/G), na região do intron 11.

Observa-se que, atualmente, a pesquisa de mutações que causam doenças genéticas tem sido dirigida às regiões promotoras, codificadoras ou nos limites intron-exon do gene em estudo. Uma seqüência intrônica possui regiões conservadas que são reconhecidas de maneira exata por pequenas partículas de nucleoproteínas ligadas a um UsnRNA (*small nuclear RNA*),

família de pequenos RNA nucleares ricos em uridina. A finalidade desse reconhecimento preciso está relacionada ao mecanismo de *splicing*, em que os introns são retirados, dando origem ao transcrito maduro de RNA formado apenas por exons. Neste processo, inicialmente ocorre a formação do ramo de RNA que dá origem a uma alça (*lariat*) com a quebra da junção exonintron da extremidade 5', reconhecida previamente pelas U1snRNP e ligação dessa extremidade a um resíduo de adenina, localizada em uma sequência conservada denominada sítio de ramificação (*branch site*), entre aproximadamente 10 a 40 nucleotídios a montante do local de *splicing* 3'. Este sítio de ramificação é reconhecido pelas U2snRNP e a região exonintron da extremidade 3' pelas U5snRNP.

Após formada a alça (*lariat*), ocorre a quebra da seqüência exon-intron da extremidade 3', separação do intron e ligação dos dois exons. Desta forma, a região conservada do intron onde está localizada a adenina (*branch points*), cuja função é importante no processo de *splicing* (RAUTMANN e BREATHNACH, 1985), pode ser considerada provável candidata para albergar mutações ainda não descritas, responsáveis por síndromes de resistência insulínica em pacientes sem evidências de mutações em regiões codificadoras. As regiões intrônicas não conservadas, provavelmente, são polimórficas com menor significado clínico.

Dos polimorfismos encontrados em região intrônica, como os do intron 7 (5885C/T e 5890A/C) da paciente DPS ou os do intron 11 (7758C/G), das pacientes LOM, MKR e EDR, devido a sua localização, aparentemente, não ocorreram em regiões conservadas descritas anteriormente. O mesmo não se pode afirmar em relação ao polimorfismo no intron 15 da paciente DPS, não descrito até o momento, cuja localização está apenas a 14 bp precedente à região de *splicing* entre os exons 15 e 16. Provavelmente, devido a sua localização, torna-se um forte candidato a constituir essas regiões conservadas e, desta forma, influenciar no processo de remoção do intron.

Especificamente, em relação ao polimorfismo no intron 7 (5890A/C), sabe-se que foi inicialmente descrito por KROOK et al. (1984), quando

pesquisou mutações no gene do receptor de insulina, encontrando esta alteração em 11/26 pacientes com síndrome de resistência insulínica, tendo concluído, portanto, que muitos polimorfismos podem ser encontrados em indivíduos normais e que devido a grande variabilidade fenotípica, provavelmente, o papel patogênico desta alteração não tenha qualquer significado.

Corroborando com esta afirmativa, TALBOT et al. (1996), estudando alterações no gene do INSR em mulheres com síndrome do ovário policístico, também encontraram este mesmo polimorfismo em 10/23 pacientes e nos 5/5 indivíduos normais, não obtendo, portanto, qualquer relação deste achado com os pacientes estudados. O outro polimorfismo neste exon (5885C/T) não foi descrito até o momento.

Para que se possa responsabilizar os polimorfismos intrônicos aqui descritos, será primeiramente necessário o seqüenciamento do cDNA. Provas de função do receptor mutante poderiam ser realizadas em células transfectadas com cDNA mutante, a fim de serem comparadas com as do INSR naturais.

Em relação aos estudos realizados com as pacientes ACS, MJS e os familiares CSS e OJO, não foram encontradas qualquer alteração de mobilidade eletroforética no SSCP. Provavelmente, esta alteração molecular possa estar localizada em região diferente da codificadora para o receptor de insulina, por exemplo, a promotora, ou ainda, após o receptor de insulina (IRS-1 ou IRS-2), uma vez que defeitos nos vários passos da via de transdução da insulina possam estar envolvidos na patogênese da resistência a insulina (KAHN, 1994).

Sabe-se que o receptor de insulina, quando ativado, tem seus resíduos de tirosina fosforilando substratos intracelulares com o objetivo de iniciar o sinal de transdução (CHEATHAM ; KAHN, 1995). Apenas há poucos anos o número desses substratos foram devidamente caracterizados. O primeiro foi o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), cuja função é servir como uma molécula ancoradoura para a sinalização de moléculas adaptadoras (MYERS et al., 1994 e SUN et al., 1991), o que conduz a ativação de outras vias de

sinalização, por exemplo, as do transporte da glicose mediado pela insulina (CHEATHAM; KAHN, 1995). Outro substrato identificado foi o substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2), que também pode ligar-se ao INRS e iniciar a transdução do sinal (SUN et al., 1995 e PATTI et al., 1995). Alguns polimorfismos e mutações já foram descritas para o gene do IRS-1 em pacientes com síndrome de resistência insulínica (ROUARD et al., 1997; ALMIND et al., 1996; URA et al., 1996 e YOSHIMURA et al., 1997) e para o IRS-2 (CHAIKA et al., 1999 e ALMIND et al., 1998). Observando-se a tabela 2, nota-se que, apesar de não terem tido qualquer alteração no SSCP, são pacientes que apresentam o quadro clínico de resistência insulínica, com acantose nigricante, hirsutismo e ovário policístico. Embora a fisiopatologia da acantose nigricante não esteja completamente esclarecida, este achado pode ser considerado um marcador clínico útil no diagnóstico da hiperinsulinemia.

Em relação aos resultados apresentados pela paciente QCS, com alteração de mobilidade eletroforética para os exons 11 e 17, mas não confirmado com o seqüenciamento, assim como, a paciente MIS, em idêntica situação para o exon 17 e a paciente EDR, para o exon 19, pode-se dizer que, provavelmente, tratam-se de quatro resultados falso-positivos para o SSCP, pois os mesmos não foram confirmados pelo seqüenciamento. Além disso, sabe-se que os exons 11, 17 e 19 são altamente polimórficos e que, muitos destes polimorfismos tem sido encontrados em indivíduos normais (KROOK et al., 1994). Ocorre também que, em relação a técnica de SSCP, bandas adicionais podem ser observadas, pois algumas moléculas de DNA. de fita simples podem adotar mais do que uma conformação.

No estudo realizado com a familiar JOM, em relação ao SSCP, notouse alteração de mobilidade eletroforética para os exons 9 e 12, sendo o seqüenciamento apenas confirmado para o exon 9, portanto, para o exon 12, cabe o explicado no parágrafo anterior. Em relação ao obtido no seqüenciamento do exon 9, observou-se a presença de três polimorfismos anteriormente descritos: Phe⁶⁴², Leu⁶¹³ e Pro⁶¹⁷, sendo os dois últimos comuns em indivíduos de origem asiática (KROOK et al., 1994). Após realizados os estudos relacionados aos possíveis polimorfismos no receptor de insulina e tendo, no exon 11, caracterizado-se a presença de polimorfismo comuns a três pacientes anteriormente analisados, utilizou-se a técnica de PCR alelo específico, em dois grupos de estudo, com o propósito de verificar-se a freqüência do alelo. O primeiro (Grupo B), constituído de 27 indivíduos com diabetes melito do tipo 2 e o segundo grupo (Grupo C), formado por 63 indivíduos normais. Esta metodologia também foi aplicada ao grupo A, constituído dos pacientes com resistência insulínica.

Trata-se de uma metodologia de amplificação alelo seletiva que é utilizada para amplificar genes mutantes que diferem do normal pela substituição de uma única base, portanto, uma amplificação específica de uma seqüência de DNA mutante na presença de quantidades elevadas de seqüências naturais. Para isto, é necessário que a polimerase tenha capacidade de elongamento e amplificação do amplímero e a seqüência a ser determinada, por hibridização total entre a extremidade 3' do amplímero e o molde. O não pareamento correto desta extremidade é desfavorável para a continuidade da reação. A Taq DNA polimerase pode, entretanto, iniciar a polimerização de uma seqüência com a extremidade 3' do amplímero não pareada, o que somente ocorre em determinadas condições (KWOK et al., 1990).

Conhecendo-se, portanto, as propriedades da Taq DNA polimerase, no que se refere ao seu emprego na metodologia descrita acima, verifica-se que esta enzima é capaz de satisfazer plenamente os critérios relacionados à técnica empregada (PCR alelo específico), tendo em vista sua alta especificidade e, ainda, favorecer a extensão de amplímeros perfeitamente hibridizados (CREIGHTON et al., 1992), com eficiência de extensão abaixo dos níveis de detecção para amplímeros e seqüências com extremidades 3' (primer.seqüência) G.G e C.C (HUANG et al., 1992).

No presente estudo, foram utilizados amplímeros para o alelo normal e para o alelo mutado (tabela 4), os quais originaram seqüências com 212 bp. Como controle positivo interno, utilizou-se amplímeros para o exon 12 do receptor de insulina, com produtos de PCR de 379 bp (figura 33). Os

controles (positivo e negativo) são de pacientes que, no seqüenciamento, apresentaram ou não a referida alteração molecular.

Observando-se os resultados apresentados na tabela 6, verifica-se que os 3 grupos estudados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação ao polimorfismo no intron 11 do INSR, pois ocorre estreita concordância entre as proporções observadas e esperadas dos alelos M e N, além do que, os valores correspondentes ao qui-quadrado, para cada grupo, são menores do que 9,21 (F_{crit}). Este novo polimorfismo não foi descrito até o momento e, os resultados obtidos, em conjunto com a análise de significância, em relação às freqüências dos alelos para os três grupos estudados, não puderam estar relacionados à síndrome de resistência insulínica e ao diabetes melito do tipo 2.

- A técnica do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), aqui empregada na prospecção de polimorfismos no gene do receptor de insulina em pacientes com síndrome de resistência insulínica grave, foi útil em indicar a necessidade do seqüenciamento dos exons que apresentaram alteração de mobilidade eletroforética.
- O seqüenciamento foi capaz de identificar dois polimorfismos contíguos ocorrendo no intron 7 - polimorfismos 5885C/T e 5890A/C e intron 15 - 10283C/T, todos na paciente DPS e um mesmo polimorfismo no intron 11 - 7758C/G em três pacientes (LOM, MKR e EDR).
- Identificou-se também, pelo seqüenciamento, três polimorfismos no exon
 9, em região codificadora, para a familiar JOM (Leu613C/T, Pro617A/C e Phe642C/T).
- As seguintes alterações de mobilidade eletroforética no PCR-SSCP puderam ser confirmadas com o seqüenciamento: exons 7, 9, 11 (três alterações) e 16. Não foram, entretanto, confirmados as alterações: exons 11 (uma alteração), 12, 17 (duas alterações) e 19.
- A técnica de PCR alelo específico foi capaz de estabelecer a freqüência do alelo mutado em pacientes com síndrome de resistência insulínica grave do tipo A, diabetes melito do tipo 2 e indivíduos normais, respectivamente, de 0,19, 0,22 e 0,29 e do alelo normal de 0,81, 0,78 e 0,71.
- Foi possível verificar, aplicando-se o teste do Qui-quadrado (X²), que o polimorfismo IVS 11 encontra-se em equilíbro de Hardy-Weinberg para os três grupos estudados.

 O polimorfismo IVS 11 não está associado à síndrome de resistência insulínica grave e ao diabetes melito do tipo 2 em relação às freqüências dos alelos para os três grupos estudados.

.

7. Resumo_

No presente estudo utilizou-se as técnicas do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e seqüenciamento manual, na prospecção e caracterização de polimorfismos no gene do receptor de insulina (INSR) em pacientes com síndrome de resistência insulínica grave. Também foi determinada a freqüência do polimorfismo de um único nucleotídio (SNP), tendo em vista a ocorrência comum em três pacientes do grupo de insulino resistentes, utilizando-se para isso da técnica de PCR alelo específico, cuja determinação também foi feita em um grupo com diabetes melito do tipo 2, em comparação com indivíduos normais.

Foi possível, portanto, caracterizar sete polimorfismos, sendo quatro em região intrônica (intron 7: 5885C/T e 5890A/C; intron 11: 7758C/G e intron 15: 10283C/T) e três em região codificadora (exon 9: Leu613C/T, Pro617A/C e Phe642C/T) no gene do receptor de insulina. Em relação ao PCR alelo específico, obteve-se que as freqüências do alelo com polimorfismo foram, respectivamente, 0,19, 0,22 e 0,29 no grupo de pacientes com resistência insulínica grave do tipo A, diabetes melito do tipo 2 e indivíduos normais. Estas freqüências estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com o teste do qui-quadrado (X²), com F_{orit} = 9,21 (*P*<0,01). O teste exato de Fisher não pode mostrar qualquer diferença estatisticamente significante (P=0,61) entre as freqüências dos três grupos estudados.

Concluiu-se, portanto, que as técnicas empregadas nesta investigação foram capazes de caracterizar sete diferentes polimorfismos, sendo três considerados novos polimorfismos (intron 7: 5885C/T, intron 11: 7758C/G e intron 15: 10283C/T), no gene do receptor de insulina.

8. Abstract

The present investigation employed single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) followed by manual cycle sequencing for the screening and characterization of polymorfisms in the insulin receptor gene (INSR) in patients with Type A insulin resistance syndrome. Furthermore, considering that 3 patients with Type A insulin resistance bore the same single nucleotide polymorphism (SNP), an allele specific PCR was applied to calculate its frequency in a group of patient with Type 2 diabetes mellitus in comparison with normal subject.

It has been possible to characterize 7 different polymorphisms, 4 located in introns (intron 7: 5885C/T and 5890A/C; intron 11: 7758C/G and intron 15: 10283C/T) and 3 in coding regions (exon 9: Leu613C/T, Pro617A/C, and Phe642C/T) of the insulin receptor gene. Allele specific PCR analysis unveiled that the frequencies of the allele with polymorphism were, respectively, 0.19, 0.22, and 0.29 in patients with Type A insulin resistance, Type 2 diabetes mellitus, and normal subjects group. These frequencies were in equilibrium to the Hardy-Weinberg law when Chi-square test was calculated with an Fcrit = 9.21 (P<0.01). Fisher exact test could not show any statistically significant differences (P=0.61) between the frequencies in the 3 studied groups.

In conclusion, with the techniques employed in this investigation we were able to characterize 7 different polymorphisms, being 3 of them considered novel polymorphisms (intron 7: 5885C/T, intron 11: 7758C/G and intron 15: 10283C/T) in insulin receptor gene.

- AVRUCH, J.; NEMENOFF, R.A.; BLACKSHEAR, P.J.; PIERCE, M.W.; OSATHANONDH, R. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in detergent extracts of humanplacental membranes J. Biol. Chem., v.257, p.15162-6, 1982.
- ACCILI,D. Molecular defects of the insulin receptor gene. Diabetes, v.11, p.47-62, 1995. Supplement 1.
- ACCILI, D.; KADOWAKI, T.; KADOWAKI, H.; MOSTHAF, L.; ULLRICH, A.; TAYLOR, S.I. Immunoglobulin heavy chain binding protein (BIP) binds to misfolded mutant insulin receptors with mutations in the extracellular domain. J. Biol. Chem., v.267, p. 586-90, 1992.
- ACCILI, D.; FRAPIER, C.; MOSTHAF, L.; MCKEON, C.; ELBEIN, S. C.; PERMUTT, M. A.; RAMOS, E.; LANDER, E.; ULLRICH, A.; TAYLOR, S.I. A mutation in the insulin receptor gene that impairs transport of the receptor to the plasma membrane and causes insulin-resistant diabetes. Embo J., v.8, p.2509-17, 1989.
- ALMIND, K.; INOUE, G.; PEDERSEN, O.; KAHN, C.R. A common amino acid polymorphism insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. J. Clin. Invest., v. 97, p.2569-75, 1996.
- AL-GAZALI, L. I.; KHALIL, M.; DEVADAS, K. A syndrome of insulin resistance resembling leprechaunism in five sibs of consanguineous parents. J. Med. Genet., v.30, p.470-5, 1993.

- AINSWORTH, P.J.; SURH, L.C.; COULTER-MACKIE, M.B. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP) : A simple nonradioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. Nucleic Acids Res., v.19, p.405-6, 1991.
- ALMIND, K.; FREDERIKSEN, S.K.; AHLGREN, M.G.; URHAMMER, S.; HANSEN, T.; CLAUSEN, J.O.; PEDERSEN, O. Common amino acid substitutions in insulin receptor, substrate-4 are not associated with type II diabetes mellitus or insulin resistance. Diabetologia, v.41, p. 969-74, 1998.
- 9. BROOKES, A.J. The essence of SNPs. Gene, v. 234, p. 177-86, 1999.
- 10. BOGARDUS, C. Insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM in Pima Indians. Diabetes Care, v.16, p.228-31, 1993.
- BARBIERI, R.L; SMITH, S.; RYAN, K.J. The role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of ovarian hyperandrogenism. Fertil. Steril., v.50, p.197, 1988.
- BARBETTI, F.; GEJMAN, P.V.; TAYLOR, S.I.; RABEN, N.; CAMA, A.; BONORA, E.; PIZZO, P.; MOGHETTI, P.; MUGGEO, M.; ROTH, J. Detection of mutations in insulin receptor gene by denaturing gradient gel electrophoresis. Diabetes, v.41, p.408-15, 1992.
- MARCUS-SAMUELS, B.; TAYLOR, S.I. Atypical antiinsulin receptor antibodies in a patient with type B insulin resistance and scleroderma. J. Clin. Endocrinol. Metab., v.68, p.227, 1989.

- 14. BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, v.232, p.34, 1986.
- BONDAR, R. J.; MEAD, D. C. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from leuconostic mesenteroides in the hexoquinase method for determining glucose in serum. Clin. Chem., v. 20,p. 586-90, 1974.
- 16. BERSON, S.A.; YALOW, R. S. Recent studies on insulin binding antibodies. Ann. N.Y. Acad. Sci., v.82, p.332-4, 1959.
- BAR, R.S; MUGGEO, M.; ROTH, J.; KAHN, C.R.; HAVRANKOVA, J.; IMPERATO-MCGINLEY, J. Insulin resistance, acanthosis nigricans, and normal insulin receptors in a young woman: evidence for a postreceptordefect. J. Clin. Endocr. Metab., v. 47. p.620-25, 1978.
- 18. CZECH, M.P. The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. **Annu. Rev. Physiol.**, v.47, p.357-81, 1985.
- CHOU, C.K.; DULL,T.J.; RUSSELL,D.S.; GHERZI, R.; LEBWOHL, D.; ULLRICH, A.; ROSEN, O. M. Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. J. Biol. Chem., v.262, p.1842-7, 1987.
- CAMA,A.;SIERRA,M.L.;QUON,M.J.;OTTINI,L.; GORDEN, P.;TAYLOR, S.I. Substitution of glutamic acid for alanine 1135 in the putative catalytic of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor a mutation impairs proteolytic processing into subunits and inhibits tyrosine kinase activity. J.Biol. Chem., v.268, p.8060-9, 1993.

- CAMA, A.; SIERRA, M.L.; OTTINI, L.; TAYLOR, S.I. A mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor that impairs insulin action and increases binding affinity for insulin. J. Cell Biochem., v. 15, p.73, 1991a.
- CAMA, A.; QUON, M.J.; SIERRA, M.L.; TAYLOR, SI. Substitution of isoleucine for methionine at position 1153 in the beta-subunit of the human insulin receptor. J. Biol. Chem., v.267, p.8383-9, 1992.
- CAMA, A.; DEILKA LUZ-SIERRA, M.; OTTINI, L.; KADOWAKI, T.; GORDEN, P.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; TAYLOR, S. I. A mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor associated with insulin resistance in an obese woman. J. Clin. Endocrinol. Metab., v.73, p.894, 1991b.
- 24. CARRERA, P.; CORDERA, R.; FERRARI, M.; CREMONESI, L.; TARAMELLI, R.; ANDRAGHETTI, G.; CADUCCI, C.; DOZIO, N.; POZZA, G.; TAYLOR, S.I. Substitution of Leu for Pro-193 in the insulin receptor in a patient with a genetic form of severe insulin resistance. Hum. Mol. Genet., v.2, p.1437, 1993.
- CREIGHTON, S.; HUANG, M.M.; CAI, H.; ARNHEIM, N.; GOODMAN, M. F. Base mispair extension kinetics: binding of avian myeloblastosis reverse transcriptase to matched and mismatched base pair termini. J. Biol. Chem., v.267, p.2633-9, 1992.
- CAMA, A.; SIERRA, M. L.; KADOWAKI, T.; KADOWAKI, H; QUON, M.J.; RUDIGER, H. W.; DREYER, M.; TAYLOR, S.I. Two mutant alleles of insulin receptor gene in a family with a genetic form of insulin resistance: 10 base pair deletion in exon 1 and a mutation of serine for asparagine-462. Hum. Genet., v.95, p.174, 1995.

- COCOZZA, S.; PORCELLINI, A.; RICCARDI, G.; MONTICELLI, A.; CONDORELLI, G.; FERRARA, A.; PIANESE, L.; MIELE, C.; CAPALDO, B; BEGUINOT, F.; VARRONE, S. NIDDM associated with mutation in tyrosine kinase domain of insulin receptor gene. Diabetes, v.41, p.521, 1992.
- 28. CHEATHAM, B.; KAHN, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. Endocr. Rev., v.16, p. 117-42, 1995.
- CHAIKA, O.V.; CHAIKA, N.; VOLLE, D.J.; HAYASHI, H.; EBINA, Y.; WANG, L.M.; PIERCE, J.H.; LEWIS, R.E. Mutation of tyrosine 960 within the insulin receptor juxtamembrane domain impairs glucose transport does not inhibit ligand-mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-2 in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem., v. 274, p. 12075-80, 1999.
- COLLINS, F. S.; BROOKS, L. D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Research, v.12, p. 1229-31, 1998.
- DE FRONZO, R.A. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: A complex metabolic. J. Cardiomuscular Pharmacology, v.20, p.1-16, 1992.
- 32. DE MEYTS, P.; GU, J.L.; SHYMKO, R.M.; KAPLAN, B.E.; BELL, G.I.; WHITTAKER, J. Identification of a ligand-binding region of the human insulin receptor encoded by the second exon of the gene. Molecular Endocrinology, v.4, p.409, 1990.

- D'ERCOLE, A. J.; UNDERWOOD, L. E.; GROELKE, J.; PLET, A. Leprechaunism: studies of the relationship among huperinsulinism, insulin resistance, and growth retardation. J. Clin. Endocrinol., v.48, p.495, 1979.
- DESBOIS-MOUTHON, C.; GIRODON, F.; GHANEM, N.; CARON, M.; PENNERATH, A.; CONTEVILLE, P.; MAGRE, J.; BESMOND, C.; GOOSSENS, M.; CAPEAU, J.; AMSELEM, S. Molecular analysis of the insulin receptor gene for prenatal diagnosis of leprechaunism in two families. Prenat. Diagn., v.17, p.657, 1997.
- DEMERS, D. B.; OLDEBERG, S. J.; FISHER, L. M. Identification of a factor IX point mutation using SSCP analysis and direct sequencing. Nucleic Acids Res., v.18, p.5575, 1990.
- DEAN, M.; WHITE, M. D.; AMOS, J.; GERRARD, B.; STEWART, C.; KHAW, K.T.; LEPPERT, M. Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildlyaffected cystic fibrosis patients. Cell,v.61, p.863-70, 1990.
- 37. EBINA, Y.; ELLIS, L.; JARNAGIN, K.; EDERY, M.; GRAF, L.; CLAUSER, E.; OU, J.H; MASIARS, F.; KAN, Y.W.; GOLDFINE, I.D.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. Cell, v.40, p.747, 1985.
- ELLIS, L.; CLAUSER, E.; MORGAN, D.O.; EDERY, M.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxy glucose. Cell, v.45, p.721-32, 1986.

- ELDERS, M.J.; SCHEDEWIE, H.K.; OLEFSKY, J.;GIVENS, B.; CHAR, F.; BIER, D. M.; BALDWIN, D.; FISER, R. H; SEYEDABADI, S.; RUBENSTEIN, A. Endocrine metabolic relationships in patients with leprechaunism. J. Natl. Med. Assoc., v.74, p.1195-210, 1982.
- FRIAS, I.; WAUGH, S.M. Probing the α- subunit interface region in the insulin receptor, location of interhalf disulfide (s). Diabetes, v.38, p.238, 1987.
- GUSTAFSON, T. A.; RUTTER, W.J. The cysteine-rich domains of the insulin and insulin-like growth factor I receptors are primary determinants of hormone binding specificity. J. Biol. Chem., v.265, p.18663-7, 1990.
- 42. GUSELLA, J.F.; WEXLER, N.S; CONNEALLY, P.M.; NAYLOR, S.L.; ANDERSON, M.A.; TANZI, R.E.; WATKINS, P.C.; OTTINA, K.; WALLACE, M.R. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington disease. Nature. v. 306, p. 234-38, 1983.
- 43. HANKS, SK.; QUINN, A.M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains Science, v.241, p.42, 1988.
- HOBBS, H.H; RUSSELL, D.W.; BROWN, M.S; GOLDSTEIN, J.L. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. Annu. Rev. Genet., v.24, p.133, 1990.
- 45. HONE, J.; ACCILI,D.; AL-GAZALI, L.I.;LESTRINGANT, G.; ORBAN, T.; TAYLOR, S.I. Homozygosity for a new mutation (lle 119 to Met) in the insulin receptor gene . J. Med. Genet., v.31, p.715, 1994.

- HARUTA, T.; TAKATA, Y.; IWANISHI, M.; MAEGAWA, H; IMAMURA, T.; EGAWA, K.; ITAZU, T.; KOBAYASHI, M. Ala 1048 ---> Asp mutation in the kinase domain of insulin receptor causes defective kinase activity insulin resistance. Diabetes, v.42, p.1837, 1993.
- HUANG, M. M.; ARNHEIM, N.; GOODMAN, M. F. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. Nucleic Acids Res., v. 20, p. 4567-73, 1992.
- 48. IMAMURA, T.; TAKATA,Y.; SASAOKA, T.; TAKADA, Y.; MORIOKA,H; HARUTA, T.; SAWA, T.; IWANISHI, M.; HU, Y. G.; SUZUKI, Y. Two naturally occurring mutations in the kinase domain of insulin receptor accelerate degradation of the insulin receptor and impair the kinase activity. J. Biol. Chem., v.269, p.31019, 1994.
- JOSPE, N.; KAPLOWITZ, P. B.; FURLANETTO, R. W. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene of a patient with severe congenit al insulin resistance: leprechaunism and the role the insulin-like growth factor receptor. Clin. Endocrinol., v.45, p.229,1996.
- JOSPE, N.; KAPLOWITZ, P. B. Homozygous mutation in the insulin receptor β-subunit of a patient with leprechaunism altering arginine 786 to a stop codon. Clin. Endocrinol., v.20, p.453, 1993.
- KASUGA, M.; KARLSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95.000 dalton subunit of its own receptor Science, v.215, p.185-7, 1982.

- 52. KNOWLER, W. C.; PETTITT, D. J.; SAAD, M. F; BENNETT, P. H Diabetes mellitus in Pima Indians: incidence, risk factors, and pathogenesis. Diabetes Metab. Rev., v.6, p.1-27, 1990.
- 53. KROOK, A.; O'RAHILLY, S. Homozygous mutation in the insulin receptor. Clinical Endocrinology, v.45, p.237-8, 1996.
- 54. KAHN, C. R.; WHITE, M. F. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. J. Clin. Invest., v.82, p.1151-6, 1988.
- KAHN, C. R.; FLIER, J. S; BAR, R. S; ARCHER, J.A.; GARDEN, P.; MARTIN, M.M.; ROTH, J. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans: insulin-receptor disorders in man. N. Engl. J. Med., v.294, p.739, 1976.
- 56. KAHN, C. R. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes, v. 43, p. 1066-84, 1994.
- 57. KADOWAKI, T.; BEVINS, C. L.;CAMA, A.; OJAMAA, K.; MARCUS-SAMUELS, B.; KADOWAKI, H; BEITZ, L.; MCKEON, C.; TAYLOR, S.I. Two mutant alleles of the insulin receptor gene in a patient with extreme insulin resistance. Science, v.240, p.787, 1988.
- KADOWAKI, T.; KADOWAKI, H; RECHLER, M.M.; SERRANO-RIOS, M.; ROTH, J.; GORDEN, P.; TAYLOR, S.I. Five mutant alleles of the insulin receptor gene in patients with genetic forms of insulin resistance. J. Clin. Invest., v.86, p.254-64, 1990a.
- KROOK, A.; BRUETON, L.; O'RAHILLY, S. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene in infant with leprechaunism. Lancet, v.342, p.277-8, 1993.

- KUSARI, T.; TAKATA, T.; HATADA, E.; FREIDENBERG, G.; KOLTERMAN, O.; OLEFSKY, J.M. Insulin resistance and diabetes due to different mutations in the tyrosine kinase domain of both insulin receptor gene alleles J. Biol. Chem., v.266, p.5260, 1991.
- KOBAYASHI,M.; SASAOKA, T.; TAKATA,Y.; HISATOMI, A.; SHIGETA,
 Y. Insulin resistance by unprocessed insulin proreceptors point mutation at the cleavage site. Biochem. Biophys Res Commun., v.153, p.657-63, 1988.
- KAKEHI, T.;HISATOMI, A.; KUZUYA, H; YOSHIMASA,Y.; OKAMOTO, M.; YAMADA, K.; NISHIMURA, H; KOSAKI, A.; NAWATA, H; UMEDA, F.; IBAYASHI, H; IMURA, H. Defective processing of insulin-receptor precursor in cultured lymphocytes from a patient with extreme insulin resistance. J. Clin. Invest., v.81, p.2020-2, 1988.
- KLINKHAMER, M. P.; GROEN, N. A.; VAN DER ZON, G. C.M.; LINDHOUT, D.; SANDKUYL, L.A.; KRANS, HM.J.; MOLLER, W.; MAASSEN, J.A. A leucine to proline mutation in the insulin receptor in a family with insulin resistance. Embo J., v.8, p.2503-7, 1989.
- KADOWAKI, T.; KADOWAKI, H; ACCILI, D.; YAZAKI, Y.; TAYLOR, S.I. Substitution of arginine for histidine at position 209 in the alphasubunit of the human insulin receptor: a mutation that impairs receptor dimerization and transport of receptors to the cell surface.
 J. Biol. Chem., v.266, p.21224-31, 1991.
- KROOK, A.; KUMAR, S; LAING, I.; BOULTON, A. J.; WASS, J.A.;
 O'RAHILLY, S. Molecular scanning of the insulin receptor gene in syndromes of insulin resistance. Diabetes, v.43, p.357, 1994.

- KAN, M.; KANAI, F.; LIDA, M.; JINNOUCHI, H; TODAKA, M.; IMANAKA,T.; ITO, K.; NISHIOKA,Y.; OHRUSHI,T.; KAMOHARA, S. Frequency of mutations of insulin receptor gene in japanese patients in NIDDM. Diabetes, v.44, p.1081, 1995.
- KADOWAKI, H; TAKAHASHI, Y.; ANDO, A.; MOMOMURA, K.; KABURAGI, Y.; QUIN, J. D.; MACCUISH, A. C.; KODA, N.; FUKUSHIMA, Y.; TAYLOR, S.I.; AKANUMA, Y.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. Four mutant alleles of the insulin receptor gene associated with genetic syndromes of extreme insulin resistance. Biochem. Biophys Res Commun., v.237, p.516, 1997.
- KADOWAKI, T.; KADOWAKI, H; TAYLOR, S.I. A nonsense mutation causing decreased levels of insulin receptor mRNA: detection by a simplified technique for direct sequencing of genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.87, p.658, 1990b.
- KADOWAKI, H; KADOWAKI, T.; CAMA, A.; MARCUS-SAMUELS, B.; ROVIRA, A.; BEVINS, C.; TAYLOR, S.I. Mutagenesis of lysine 460 in the human insulin receptor effects upon receptor recycling and cooperative interactions among binding sites J. Biol. Chem., v.265, p.19143, 1990c.
- 70. KNOWLTON, R.G.; COHEN-HAGUENAUER, O.; VAN CONG, N.; FREZAL, J.; BROWN, V. A.; BARKER, D.; BRAMAN, J. C.; SCHUMM, J.W.; TSUI, L.C. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. Nature. v. 318, p. 380-82, 1985.
- KISHIMOTO, M.; HASHIRAMOTO, M.; YONEZAWA, K.; SHII, K.; KAZUMI, T.; KASUGA, M. Substitution of glutamine for arginine 1131. A newly identified mutation in the catalytic loop of the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. J. Biol. Chem., v.269, p.11349, 1994.
- 72. KIM, H; KADOWAKI, H.; SAKURA, H; MOMOMURA, K.; TAKAHASHI, Y.; MIYAZAKI, Y.; OHTANI, T.; AKANUMA, Y.; YAZAKI, Y.; KASUGA, M.; TAYLOR, S. I.; KADOWAKI, T. Detection of mutations in insulin receptor gene in patients with insulin resistance by analysis of single stranded conformational polymorphisms Diabetologica. v.35, p.261-6, 1992.
- KWOK, S.; KELLOGG, D.E.; MCKINNEY, N.; SPASIC, D.; GODA, L.; LEVENSON, C.; SNINSKY, J. J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucleic Acids Res., v. 18, p.999-1005, 1990.
- KEIGHTLEY, A.M.; LAM, Y.M.; BRADY, J.N.; CHERIE, L.; LILLICRAP, D. Variation at the von Willebrand Factor (vWF) gene locus is associated with plasma vWF: Ag levels: identification of three novel single nucleotide polymorphisms in the vWF gene promoter. Blood, v. 93, p. 4277-83, 1999.
- LILLIOJA, S; MOTT, D.M.; SPRAUL, M.; FERRARO, R.; FOLEY, J.E.; RAVUSSIN, E.; KNOWLER, W.C.; BENNETT, P. H; BOGARDUS, C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus: prospective studies of Pima Indians N. Engl. J. Med., v.329, p.1988-92, 1993.

- LONGO, N.; LANGLEY, S.D.; GRIFFIN, L.D.; ELSAS, L. J. Reduced mRNA and a nonsense mutation in the insulin-receptor gene produce heritable severe insulin resistance. Am. J. Hum. Genet., v.50, p.998-1007, 1992.
- LEVY-TOLEDANO, R.; CARO, L. P.; ACCILI, D.; TAYLOR, S.I. Investigation of the mechanism of the dominant negative effect of mutations in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. Embo J., v.13, p.835-42, 1994.
- LARSSON, C.; SKOGSEID, B.; OBERG. L.; NAKAMURA, Y.; NORDENSKJOLD, M. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. Nature, v. 332, p.85-87, 1988.
- LONGO, N. Defective receptors for platelet-derived growth factor AA in human fibroblasts with mutant insulin receptors. Biochem. Bioph Res Commun., v.197, p.812, 1993a.
- LANDER, E. S; BOTSTEIN, D. Homozygosity mapping : a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. Science, v.236, p.1567-70, 1987.
- 81. LONGO, N.; LANGLEY, SD.; GRIFFIN, L. D.; ELSAS, L.J. Activation of glucose transport by a natural mutation in the human insulin receptor. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA,** v.90, p.60-4, 1993b.
- 82. MOLLER, D.E.; FLIER, J. S. Insulin resistance-mechanisms, syndromes, and implications **N. Engl. J. Med.,** v.325, p.938-48, 1991.

- MASHIYAMA, S.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Screening of multiple DNA samples for detection of sequence changes. Technique, v. 2, p. 304-6, 1990.
- MAMULA, P.W.; WONG, K.Y.; MADDUX, B.A.; MCDONALD, A.R.; GOLDFI,
 I.D. Sequence and analysis of promoter region of human insulinreceptor gene. Diabetes, v.37, p.1241-6, 1988.
- MITCHELL, P.J.; TJIAN, R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding protein. Science, v.245, p.371-8, 1989.
- MCKEON, C.; MONCADA, V.;PHAM,T.;SALVATORE,P.; KADOWAKI, T.; ACCILI, D.; TAYLOR, S.I. Structural and functional analysis of the insulin receptor promoter. Mol. Endocrinol., v.4, p.647-56, 1990.
- MARTIN, B.C.; WARRAM, J.H; KROLEWSKI, A.S.; BERGMAN, R.N.; SOELDNER, J. S.; KAHN, C. R. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. Lancet, v.340, p.925-9, 1992.
- MATSUURA, N.; TONOKI, H; OKUNO, A.; FUJIEDA, K. A case of leprechaunism: its insulin-receptor gene analysis. Diabetes, v.40, p.113, 1991.
- 89. MAASEN, J. A.; VAN DER VORM, E. R.; VAN DER ZON, G. C. M.; KLINKHAMER, M. P.; KRANS, M. J.; MOLLER, W. A leucine to proline mutation at position 233 in the insulin receptor inhibits cleavage of the pro-receptor and transport to the cell surface. Biochemistry, v.30, p.10778, 1991.

- MOLLER, D.E.; YOKOTA, A.; WHITE, M.F.; PAZIANOS, A.G.; FLIER, J.S. A naturally occurring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. J. Biol. Chem., v.254, p.14979, 1990a.
- 91. MULLER-WIELAND, D.; VAN DER VORM, E. R.; STREICHER, R.; KRONE, W.; SEEMANOVA, E.; DREYER, M.; RUDIGER, H.W.; ROSIPAL, S.R.; MAASSEN, J.A. An in- frame insertion in exon 3 and a nonsense mutation in exon 2 of the insulin receptor gene associated with severe insulin resistance in a patient with Rabson-Mendenhall syndrome. Diabetologica, v.36, p.1168, 1993.
- 92. MOLLER, D.E.; YOKOTA, A.; WHITE, M.F.; PAZIANOS, A.G.; FLIER, J.S. A naturally occuring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. J. Biol. Chem., v.265, p.14979-85, 1990b.
- 93. MORITZ, W.; FROESH, E. R.; BONI-SCHNETZLER, M. Functional properties of a heterozygous mutation (Arg1174--->Gln) in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor from a type A insulin resistant patient. Febs Letts, v.351, p.276, 1994.
- 94. MOLLER, D.E.; FLIER, J.S. Detection of an alteration in the insulinreceptor gene in a patient with insulin resistance, acanthosis nigricans, and the polycystic ovary syndrome (type A insulin resistance). N. Engl. J. Med., v.319, p.1526, 1988.
- 95. MICHAUD, J.L.; BRODY, L.C.; STEEL, G.; FONTAINE, G.; MARTIN, L. S. Strand-separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine Δaminotransferase gene. Genomics, v.13, p.389-94, 1992.

- MAXAM, A.M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 74, p.560, 1977.
- 97. MYERS, M.G.; SUN, X.J.; WHITE, M.F. The IRS-1 signaling system. Trends Biochem. Sci., v. 19, p. 289-93, 1994.
- MATHEW, W.W.; SMITH, B.A.; THORPE, K.; WONG, Z.; ROYLE, N. J.; JEFFREYS, A. J.; PONDER, B.A. Deletion of genes on chromosome 1 in endocrine neoplasia. Nature, v.328, p. 524-6, 1987.
- MAHABEER, S.; JIALAL, I.; NORMAN, R.J.; NAIDOO, C.; REDDI, K.; JOUBER, T. S. Insulin and C-peptide secretion in non-obese patients with polycystic ovarian disease. Horm. Metab.Res. v. 21, p. 502-6, 1989.
- 100. MYERS, R.M.; LARIN, M.Z.; MANIATIS, T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. Science, v. 230, p. 1242-6, 1985;
- 101. NEELEY, W.E. Simple automated determination of serum or plasma glucose by a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method. Clin. Chem., v.18, p.509-15, 1972.
- 102. NOLL, W. W.; COLLINS, M. Detection of human DNA polymorphism with a simplified denaturing gradient gel electrophoresis technique. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 3339-43, 1987.

- 103. O'RAHILLY, S.; CHOI, W.H; PATEL, P.; TURNER, R.C.; FLIER, J.S.; MOLLER, D.S. Detection of mutations in the insulin receptor gene in non-insulin dependent diabetic patients by analysis of singlestranded conformation polymorphisms. Diabetes, v.40, p.777, 1991.
- 104. OJAMAA, K.; HEDO, J. A.; ROBERTS, C. T.; MONCADA, V.Y.; GORDEN, P.; ULLRICH, A.; TAYLOR, S.I. Defects in human insulin receptor gene expression. **Molec. Endocr.,** v.2, p.242-7, 1988.
- 105. ODAWARA, M; KADOWAKI, T.; YAMAMOTO, R.; SHIBASAKI, Y.; TOBE, K.; ACCILI, D.; BEVINS, C.; MIKAMI, Y.; MATSUURA, N.; AKANUMA, Y.; TAKAKU, F.; TAYLOR, S.I.; KASUGA, M. Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. Science, v.245, p.66-8, 1989.
- 106. ORITA, M.; IWAHANA, H; KANAZAWA, H; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 86, p. 2766-70, 1989a.
- 107. ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, v. 5, p. 874-79, 1989b.
- 108. PETRUZZELLI, L. M.; GANGULY, S.; SMITH, C. J.; COBB, M.H; RUBIN, C.S.; ROSEN, O.M. Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.79, p.6792-6, 1982.

- 109. PAN, Y.; METZENBERG, A.; DAS, S.; JING, B.; GITSCHIER, J. Mutations in the V2 vasopressin receptor gene are associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. Nature Genetics, v.2, p.103-6, 1992.
- 110. PASQUALI,R.; VENTUROLI,S.; PARADISI, R.; CAPELLI,M.; PARENTI,
 M.; MELCHIONDA, N. Insulin and C -peptide levels in obese with polycystic ovaries. Horm. Metab. Res., v.14, p.284-7, 1982.
- 111. PILLAY, T. S.; XIAO, S.; OLEFSKY, J. M. Glucose-induced phosphorylation of the insulin receptor. Functional effects and characterization of phosphorylation sites. J. Clin. Invest., v.93, p.613-20, 1996.
- 112. PORETSKY, L. On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states **Endocr. Rev.,** v.12, p.3, 1991.
- 113. PATTI, M.E.; SUN, X.J.; BRUENING, J.C.; ARAKI, E.; LIPES, M. A.; WHITE, M.F.; KANH, C.R. 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. J. Biol. Chem., v. 270, p. 24670-3, 1995.
- 114. REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v.37, p.1595, 1988.
- 115. RAFAELOFF, R.; PATEL, R.; YIP, C.; GOLDFINE, I.D.; HAWLEY, D.M. Mutation of the high cysteine region of the human insulin receptor alpha-subunit increases insulin receptor binding affinity and transmembrane signaling. J. Biol. Chem., v.264, p.15900-4, 1989.

- 116. ROUARD, M.; MACARI, F.; BOUIX, O.; LAUTIER, C.; BRUN, J. F.; LEVEBVRE, P.; RENARD, E.; BRINGER, J.; RENARD, E.; BRINGER, J.; JAFFIOL, C.; GRIGORESCU, F. Identification of two novel insulin receptor mutations, Asp59Gly and Leu62Pro, in type A syndrome of extreme insulin resistance. Biochem. Biophys Res Commun., v.234, p.764, 1997.
- 117. ROSEN, O.M.; Structure and function of insulin receptors. Diabetes, v.38, p.1508-11, 1989.
- 118. ROSEN, O.M. After insulin binds Science, v.237, p.1452-8, 1987.
- 119. ROTH, R.A.; BEADOIN, J. Phosphorylation of purified insulin receptors by cAMP kinase. **Diabetes**, v.36, p.123-6, 1987.
- 120. REAVEN, G.; BERNSTEIN, R.; DAVIS, B.; OLEFSKY, J. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? An. J. Med., v.60, p.80-8, 1976.
- 121. RABSON, S. M.; MENDENHALL, E. N. Familial hipertrophy of pinealbody, hyperplasia of adrenal cortex and diabetes mellitus. Am. J. Clin. Path, v.26, p.283-90, 1956.
- 122. REDDY, S. S.; KAHN, C.R. Epidermal growth factor receptor defects in leprechaunism: a multiple growth factor resistance syndrome.
 J. Clin. Invest., v.84, p.1569, 1989.
- 123. REEDERS, S.T.; BREUNING, M.H; DAVIES, K.E.; NICHOLLS, R.D.; JARMAN, A.P.; HIGGS, D.R.; PEARSON, P.L.; WEATHERALL, D.J. A higly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome16. Nature. v. 317, p.542-44, 1985.

- 124. RAUTMANN, G.; BREATHNACH, R. A role for branchpoints in splicing in vivo. Nature, v. 315, p. 430-2, 1985.
- 125. SEINO, S.; SEINO, M.; BELL, G.I. Human insulin-receptor gene. Diabetes, v.39, p.129, 1990.
- 126. SEINO, S.; SEINO, M.; NISHI, S.; BELL, G.I. Structure of human insulin receptor gene and the characterization of its promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.86, p.114, 1989a.
- 127. SEINO, S.; BELL, G.I. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. Biochem. Biophys Res Commun., v.157, p.312, 1989b.
- 128. SUN, X.J.; ROTHENBERG, P.; KAHN, C.R.; BACKER, J.M.; ARAKI, F.; WILDEN, P.A.; CAHILL, D.A.; GOLDSTEIN, B. J.; WHITE, M.F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 define a unique signal transduction protein. Nature, v.352, p.73, 1991.
- 129. SHIMADA, T.; TAIRA, M.; SUZUKI, Y.; HASHIMOTO, N.; NOZAKI, O.; TATIBANA, M.; EBINA, Y.; TAWATA, M.; ONAYA, T.; MAKINO, H; YOSHIDA, S. Insulin-resistant diabetes associated with partial deletion of insulin receptor gene. Lancet, v.335, p.1179, 1990.
- 130. SUZUKI,Y.;HATANAKA, Y.; SHIMADA, F.; NOZAKI, O.; TAKAYANAGI, M.; MAKINO, H; YOSHIDA, S. Insulin resistance associated with decreased levels of insulin receptor mRNA. Diabetes, v.41, p.90, 1992.

- 131. SCHAFFER, L.; LJUNGQVIST, L. Identification of a disulfide bridge connecting the α-subunits of the extracellular domain of the insulin receptor. Biochem. Biophys Res Commun., v. 189, p. 650-3, 1992.
- 132. SAIKI R.; GELFAND, D.H; STOFFEL, S.; SCHARF, SJ.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, L. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science, v. 239, p. 487-91, 1988.
- 133. SOLOMON, E.; VOSS, R.; HALL, V.; BODMER, W.F.; JASS, J.R.; PATEL, I.; RIDER, S. H. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. Nature, V. 328, p. 616-19, 1987.
- 134. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 74, p. 5463, 1977.
- 135. SUN, X.J. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. Nature, v. 377, p. 173-7, 1995.
- 136. TAKAYAMA, S.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. Phorbol ester-induced serina phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. J. Biol. Chem., v.263, p.3440-7, 1988.
- 137. TAYLOR, S.I.; KADOWAKI, T.; KADOWAKI, H; ACCILI, D.; CAMA, A.; MCKEON, C. Mutations in the insulin receptor gene in insulin resistant patients. Diabetes Care, v.13, p.257-9, 1990.
- 138. TAYLOR, R. Insulin action. Clinical Endocrinology, v.34, p.159-71, 1991a.

- 139. TAYLOR, S.I. Insulin actions and inativation. Clin. Res, v.35, p.459, 1987.
- 140. TAYLOR, S.I. Molecular mechanisms of insulin resistance. Diabetes, v.41, p.1473-90, 1992.
- 141. TAYLOR, S.I. Insulin receptors: structure and function. Endocrinol. Diab., v.1, p.231-8, 1994.
- 142. TAKAHASHI, Y.; KADOWAKI, H; ANDO, A.; QUIN, J.D.; MACCUISH, A.; YAZAKI, Y.; AKANUMA, Y.; KADOWAKI, T. Two aberrant splicings caused by mutations in the insulin receptor gene in culture lymphocytes from patient with Rabson-Mendenhall's syndrome. J.Clin.Invest.,v.101,p.588,1998
- 143. TEWARI, D. S.; COOK, D. M.; TAUB, R. Characterization of the promoter region and 3' end of the human insulin receptor gene. J. Biol. Chem., v.264, p.16238-45, 1989.
- 144. TAYLOR, S. I. Receptor defects in patients with extreme insulin resistance. Diabetes Metab. Rev., v.1, p.171, 1985.
- 145. TAYLOR, S. I.; CAMA, A.; ACCILI, D.; BARBETTI, F.; IMANO, E.; KADOWAKI, H.; KADOWAKI, T. Genetic basis of endocrine disease 1: molecular genetics of insulin resistant diabetes mellitus J. Clin. Endocrinol. Metab., v.73, p.1158, 1991b.
- 146. TAKATA, Y.; EGAWA, K.; IWANISHI, M.; IMAMURA, T.; KOBAYASHI, M. Insulin resistance due to impaired processing of the mutant receptor . Diabetes, v.42, p.217, 1993.

- 147. TAYLOR, S.I.; SAMUELS, B.; ROTH, J.; KASUGA, M.; HEDO, J.A.; GORDEN, P.; BRASEL, D.; POCORA, T.; ENGEL, R.R. Decreased insulin binding in cultured lymphocytes from two patients with extreme insulin resistance. J. Clin. Endocrinol. Metab., v.54, p.919-30, 1982.
- 148. TAIRA, M.; HASHIMOTO, N.;SHIMADA, F.; SUZUKI,Y.; KANATSUKA, A.; NAKAMURA, F.; EBINA, Y.; TATIBANA, M.; MAKINO, H; YOSHIDA, S. Human diabetes associated with a deletion of the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. Science, v.245, p.63-6, 1989.
- 149. TANZI, R. E.; GUSELLA, J. F.; WATKINS, P. C.; BRUNS, G. A. P.; NEVE, R.L. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science, v. 235, p.880-84,1987.
- 150. TAILLON-MILLER, P.; PIERNOT, E.E.; KWOK, P.Y. Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery. **Genoma Research**, v. 9, p. 499-505, 1999.
- 151. TALBOT, J.; BICKNELL, E.J.; RAJKHOWA, M.; KROOK, S. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycistic ovarian syndrome. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.81, p. 1979-83, 1996.
- 152. ULLRICH, A.; BELL, J.R.; CHEN, E.Y.; HERRERA, R.; PETRUZZELLI, L.M.; DULL, T. J.; GRAY, A.; COUSSENS, L.; LIAO, Y. C.; TSUBOKAWA, M.; MASON, A.; SEEBURG, P.H; GRUNFELD, C.; ROSEN, O.M.; RAMACHANDRAN, J. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase . Nature, v.313, p.756, 1985.

- 153. URA, S. Molecular scanning of the IRS-1 gene in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: identification of five novel mutations in IRS-1 gene. **Diabetologia**, v. 39, p. 600-8, 1996.
- 154. VAN DER VORM, E.R.; VAN DER ZON,G.C.M.; MOLLER, W.; KRANS, HM.; LINDHOUT, D.; MAASSEN, J. A. An arg for gly substitution at position 31 in the insulin receptor linked to insulin resistance inhibits receptor processing and transport. J. Biol. Chem., v.267, p.66-71, 1992.
- 155. VAN DER VORM, E. R.; KUIPERS, A.; KIELKOPF-RENNER, S.; KRANS, H.M.J.; MOLLER, W.; MAASSEN, J. A mutation in the insulin receptor that impairs proreceptor processing but not insulin binding. J. Biol. Chem., v.269, p.14297-302, 1994.
- 156. XU, Q. Y.; PAXTON, R. J.; FUJITA-YAMAGUCHI, Y. Substructural analysis of the insulin receptor by microsequence analysis of limited tryptic fragments isolated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in the absence or presence of dithiothreitol. J. Biol.Chem.,v.265,p.18673-81,1990.
- 157. WHITEHEAD, J.P.; SOOS, M.A.; JACKSON, R.; TASIC, V.; KOCOVA, M.; O'RAHILLY, S. Multiple molecular mechanisms of insulin receptor dysfunction in a patient with Donohue syndrome. Diabetes, v.47, p. 1362-4, 1998.
- 158. WHITE, M. F.; SHOELSON, S. E.; KEUTMAN, H; KAHN, C.R. A cascate of tyrosine autophosphorylation in the β-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. J. Biol. Chem., v.263, p.2969-80, 1988.

- 159. WARRAM, J.H; MARTIN, B.C.; KROLEWSKI, A.S.; SOELDNER, J.S.; KAHN, C.R. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents Ann. Intern. Med., v.113, p.909-15, 1990.
- 160. WAJCHENBERG, B. L.; GIANNELLA-NETO, D.; LERARIO, A. C.; MARCONDES, J.A.M.; OHNUMA, L.Y. The role of obesity and hyperinsulinemia in the insulin resistance of obese subjects with the clinical triad of polycistic ovaries, hirsutism and acanthosis nigricans. Hormone Res, v.29, p.7, 1988.
- 161. WERTHEIMER, E.; BARBETTI, F.; MUGGEO, M.; ROTH, J.; TAYLOR, S.I. Two mutations in a conserved structural motif in the insulin receptor inhibit normal folding and intracellular transport of the receptor. J. Biol. Chem., v.269, p.7587-92, 1994.
- 162. WEBSTER, N.J.G.; KONG, Y.; CAMERON, K.E.; RESNIK, J.L. An upstream element from the human insulin receptor gene promoter contains binding sites for C/EBPb and NF-1. Diabetes, v.43, p.305-12, 1994.
- 163. WU, J.; GRIFFITH, B. B.; BASSINGER, S.; MOEHLENKAMP, C.; BRODIE, S. G.; WU, Y.; GRIBBLE, G. G.; TROUP, G. M.; WILLIAMS, T.M. Strategies for unambiguous detection of allelic heterozygosity via direct DNA sequencing of PCR products: application to the HLA DRB1 locus. Mol. Diagn., v.1, p.89-98, 1996.

- 164. WANG,D.G.; FAN,J. B.;SIAO,C.J.;BERNO,A.;YOUNG, P.; SAPOLSKY, R.; GHANDOUR, G. ; PERKINS, N.; WINCHESTER, E.; SPENCER, J.; KRUGLYAK, L.; STEIN, L.; HSIE, L.; TOPALOGLOU, T.; HUBBELL, E.; ROBINSON, E.;MITTMANN, M.; MORRIS, M. S.; SHEN, N.; LANDER, E. S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science, v. 280, p. 1077-82, 1998.
- 165. YANG-FENG, T.L.; FRANKE, U.; ULRICH, A. Gene for human insulin receptor: localization to a site on chromossome 19 involved in precell leukemia. **Science**, v.228, p.63, 1985.
- 166. YARDEN, Y.; ULLRICH, A. Growth factor receptor tyrosine kinases Annu. Rev. Biochem., v.57, p.443-78, 1988.
- 167. YOSHIMASA, Y.; PAUL, J.I.; WHITTAKER, J.; STEINER, D.F. Effects of amino acid replacements within the tetrabasic cleavage site on the processing of the human insulin receptor precursor expressed in chines hamster ovary cells J. Biol. Chem., v.265, p.17230, 1990.
- 168. YOSHIMASA, Y.; SEINO, S.; WHITTAKER, J.; KAKCHI, T.; KOSAKI, A.; KUSUYA, H; IMURA, H; BELL, G.I.; STEINER, D.F. Insulin resistant diabetes due a point mutation that prevents insulin proreceptor processing. Science, v.240, p.784, 1988.
- 169. YOKOTA, A.; MOLLER, D.E.; FLIER, J.S. Homozygous mutation at position 485 of the insulin receptor a-subunit in a patient with lipodystrophy and severe insulin resistance. **Diabetes**, v.39, p.235, 1990.

- 170. YIP, C.C. The insulin-binding domain of insulin receptor is encoded by exon 2 and exon 3. J. Cell Biochem., v.48, p. 19-25, 1992.
- 171. YOSHIMURA, R. Impact of natural IRS-1 mutations on insulin signals. Diabetes, v. 46, p. 929-36, 1997.