

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E PEDIATRICHE  
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE PEDIATRICHE XXIV CICLO

Dott.ssa Maria Andoloro

L'IPERINSULINISMO CONGENITO DELL'INFANZIA E IL REGISTRO ITALIANO  
(RICI)

Tesi

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Manuela Caruso

A.A. 2011-2012

## INDICE

### I PARTE

- Premessa.....PAG. 3
- L'epidemiologia e l'eziologia.....PAG 4
- Fisiopatologia della secrezione insulinica.....PAG 6
- La patogenesi del CHI .....PAG 9
  - channelopathies e metabolopathies
  - forme sindromiche
- Forme diffuse e Forme focali: aspetti istopatologici e correlazione con la genetica.....PAG 19
- La clinica.....PAG 23
- La diagnosi.....PAG 25
  - metodi per differenziare la forma focale dalla forma diffusa
  - metodi invasivi
  - metodi non invasivi
- La terapia: trattamento farmacologico e trattamento chirurgico.....PAG 32
- La prognosi.....PAG 40

### II PARTE

- Il registro italiano dell'iperinsulinismo dell'infanzia (RICI).....PAG 41
- I risultati.....PAG 52
- Le conclusioni.....PAG 65

### III PARTE

- I ringraziamenti.....PAG 68
- La bibliografia.....PAG 69

## PREMESSA

Con il termine di Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia (CHI) ci si riferisce ad un gruppo eterogeneo di malattie, differenti tra loro dal punto di vista clinico, genetico e anatomopatologico. Più correttamente si dovrebbe parlare di “inappropriata secrezione di insulina”; infatti i pazienti affetti da CHI non presentano necessariamente livelli circolanti di insulina elevati in assoluto, ma livelli inappropriati rispetto ai valori glicemici (1,2). L'iperinsulinismo congenito dell'infanzia (CHI) rappresenta la causa più comune di ipoglicemia persistente in età pediatrica. Considerando che le ipoglicemie persistenti e ricorrenti possono essere causa di handicap neurologico, una diagnosi tempestiva e una pronta istituzione della terapia sono necessarie per evitare le temibili complicanze. Nonostante i progressi nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base di questa patologia e nella diagnostica delle diverse forme di CHI molto è ancora da fare per migliorare la prognosi dei pazienti affetti. Inoltre, l'incidenza delle principali complicanze correlate all'ipoglicemia persistente, riportate con incidenza del 50% in alcune casistiche (3), si è solo leggermente ridotta negli ultimi vent'anni, il che sta ad indicare che la corretta gestione e il corretto trattamento di questa malattia sono ancora da migliorare (4,5,6). Tale miglioramento è perseguibile attraverso l'ampliamento delle conoscenze su epidemiologia, diagnosi, correlazione genotipo-fenotipo e terapia. I Registri di malattia sono un importante strumento per raccogliere e analizzare dati utili a questi scopi, per tale motivo nell'ambito di un PRIN (**prot. 2006063299\_002**) è stato istituito il Registro Italiano Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia (RICI).

Questa tesi di Dottorato verte sui risultati ottenuti con l'istituzione del Registro, e la relativa analisi dei dati raccolti ad oggi.

## **L'epidemiologia e l'eziologia**

L'Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia (CHI) è una malattia rara e i dati epidemiologici sono carenti. Sono state descritte sia forme sporadiche che familiari. Le forme sporadiche hanno un'incidenza di 1:20-50.000 (7). E' stata riportata un'incidenza di 1:20.000 in Kuwait (8), di 1:27.000 in Irlanda (9), 1:40.000 in Finlandia (10) e 1:50.000 in Olanda (11). Tuttavia, in alcune comunità isolate in Finlandia e in popolazioni Arabe con elevato livello di consanguineità sono state riportate incidenze pari a 1:3000 e 1:2.300, rispettivamente (7,10). Le mutazioni a carico dei geni ABCC8 e KCNJ11 sono le più comuni cause di CHI rappresentando il 40-45% di tutti i casi finora conosciuti; mentre altre mutazioni a carico di altri geni sono state identificate nel 5-10% dei casi. L'eziologia genetica rimane sconosciuta ancora nel restante 45-55% dei casi. In un 55-60% dei casi non responsivi al Diazossido è stata riscontrata la forma focale di CHI (FoHi), mentre il 40-45% presenta la forma diffusa (DiHi), almeno nei paesi occidentali (3). Il rapporto dell'incidenza maschi/femmine è di 1.2:1 nella forma diffusa e 1.8:1 nella forma focale.

Da ciò si può desumere che poiché, le basi genetiche sono marcatamente eterogenee e molti difetti genetici sono ancora da individuare, non si può escludere che diverse popolazioni presentino oltre che una diversa incidenza, anche una diversa frequenza e distribuzione delle varie forme genetiche, che a loro volta si rifletterà in una diversa frequenza e distribuzione di fenotipi clinici.

Il CHI è una patologia eterogenea dal punto di vista genetico e ad oggi sono state descritte mutazioni a carico di 7 diversi geni: ABCC8, KCNJ11, GLUD1, GCK, HADH, HNF4A E SLC16A1. Sebbene mutazioni dominanti siano state riportate in alcuni di questi geni, le forme di CHI ereditate recessivamente sono più comuni. Le mutazioni a carico di ABCC8 e KCNJ11 sono di gran lunga la causa più frequente di CHI e rappresentano il 40-45% di tutti i casi [12]. Di questi il 50-60% sono spiegati da mutazioni di ABCC8 e il 10-15% da mutazioni di KCNJ11 [13]. Gli altri 5 geni risultano coinvolti nel 5-10% dei casi e nel restante 45-55% dei casi l'eziologia genetica rimane sconosciuta [12].

**Tabella 1. Cause genetiche dell'Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia (CHI)**

<b>Cause genetiche di CHI</b>			
<b>Gene</b>	<b>Proteina</b>	<b>Meccanismo</b>	<b>Trasmissione</b>
ABCC8	SUR1 (Recettore 1 della sulfanilurea)	Difettoso funzionamento della subunità SUR1 del canale del K <sup>+</sup>	AD/AR
KCNJ11	Kir 6.2	Difettoso funzionamento della subunità Kir 6.2 del canale del K <sup>+</sup>	AD/AR
GLUD 1	Glutammato deidrogenasi	Mancata inibizione della produzione di $\alpha$ -chetoglutarato con conseguente incremento del rapporto ATP/ADP e quindi dell'inibizione del canale K <sup>+</sup> ATP-dipendente	AD
GCK	Glucocinasasi	Aumento dell'affinità della GCK per il glucosio	AD
HADH	L-3-idroacil-CoA deidrogenasi	Sconosciuto	AR
SLC16A1	Monocarboxilate transporter 1 (MCT1)	Aumentata espressione di MCT1	AD
HNF4A	Hepatic Nuclear Factor 4 $\alpha$	Sconosciuto	AD

AD, autosomica dominante; AR, autosomica recessiva.

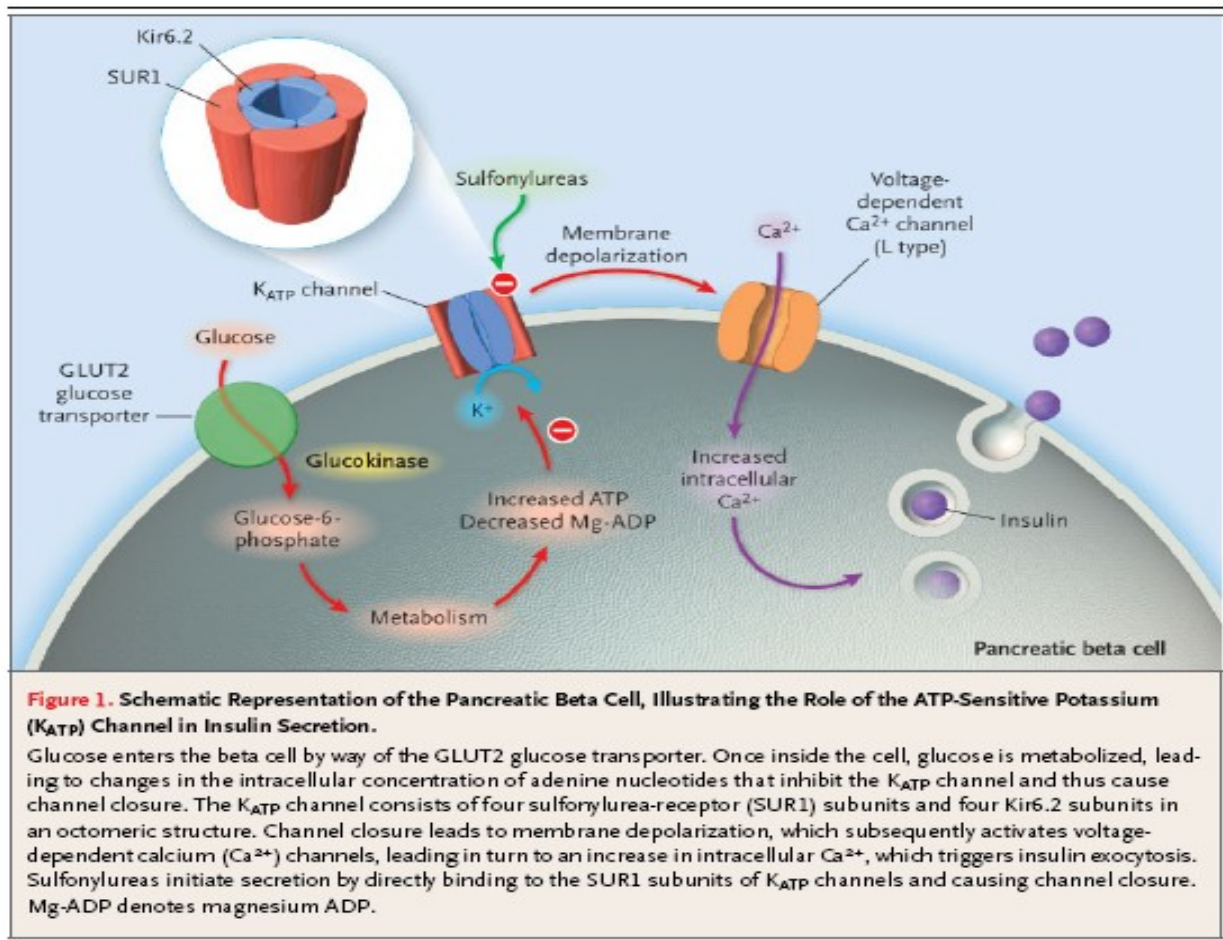
### ***Fisiopatologia della secrezione insulinica***

L' iniziale osservazione che l'iperinsulinismo congenito fosse una conseguenza di un alterato rilascio insulinico da parte delle cellule  $\beta$ -pancreatiche risale a più di vent'anni fa (1). Nella cellula  $\beta$  pancreatica la chiave principale per la sensibilità ai livelli glicemici è costituita dal canale del  $K^+$  ATP-dipendente. Il suo corretto funzionamento permette di coordinare l'accoppiamento tra sensibilità ai livelli glicemici e secrezione insulinica, per determinare entrambe le fasi del rilascio insulinico da parte del pancreas (Figura 1). Durante le condizioni basali, il potenziale di membrana delle cellule  $\beta$ pancreatiche è attorno a  $-65$  mV, tale valore è mantenuto dall'azione delle pompe  $Na^+-K^+$  ATP-dipendenti, e permette un passaggio di  $K^+$  attraverso il canale del  $K^+$  ATP-dipendente che in tali condizioni rimane aperto (14). Dopo l'ingresso nella cellula attraverso il suo trasportatore GLUT1, il glucosio viene fosforilato ad opera della Glucochinasi (GCK) e successivamente viene sottoposto al processo glicolitico, che associato ad altri eventi intramitocondriali, porta all'aumento del rapporto ATP/ADP stimolando la chiusura del canale. La chiusura del canale facilita la depolarizzazione della membrana cellulare e la successiva apertura dei canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti porta ad un marcato incremento del  $Ca^{2+}$  intracellulare vicino alla membrana plasmatica, che dà inizio all' esocitosi di granuli contenenti insulina (*triggering pathway*). Si ha così la "prima fase" di rilascio insulinico che consiste nella secrezione di granuli contenenti insulina preformati a livello della membrana plasmatica. Il canale del  $K^+$  determina anche la seconda fase del rilascio insulinico poiché la sua chiusura è strettamente accoppiata al mantenimento dell'afflusso  $Ca^{2+}$  dentro la cellula che regola l'"*amplification pathway*" (viene così chiamata la fase che riguarda la preparazione di nuovi granuli non precedentemente candidati all'esocitosi). I meccanismi molecolari precisi che sono alla base di questa seconda via non sono del tutto chiariti, però sembra che altri due siano i fattori di accoppiamento che facilitano il processo: molecole derivate dai processi mitocondriali (ad esempio long-chain acyl CoA) e la stimolazione della protein chinasi A e C (come avviene durante la secrezione ormonale di neuropeptidi e neurotrasmettitori) (15,16)

Contemporaneamente ai meccanismi responsabili del rilascio insulinico, il metabolismo glucidico è anche responsabile della produzione di nuove molecole di insulina attraverso la traslazione di mRNA insulinico preformato e l'aumento del mRNA stesso attraverso un aumento di trascrizione del gene dell'insulina. Un ruolo determinante per la trascrizione del gene dell'Insulina è svolto dal

fattore di trascrizione PDX1 che viene fosforilato durante il metabolismo glucidico e traslocato nel nucleo (17). Inoltre PDX1 si lega anche ai promotori di molti altri geni, espressi in modo preferenziale nella cellula  $\beta$ -pancreatica, tra i quali il trasportatore per il glucosio GLUT2, la glucochinasi ed il recettore per le sulfaniluree. Visto il ruolo centrale svolto da PDX1 nel metabolismo glucidico, è tutt'oggi oggetto di studio la sua funzione specifica nell'iperinsulinismo nell'uomo. E' da notare infatti che una inadeguata attività di PDX1 è una caratteristica fenotipica delle linee  $\beta$ -cellulari umane dell'iperinsulinismo (NES2Y) (18). Inoltre PDX1 è regolato dall'*Hepatocyte nuclear factor 3  $\beta$*  (FOXA2), l'assenza del quale, nelle linee  $\beta$ -cellulari dei topi, porta allo sviluppo dell'iperinsulinismo (19).

Poiché il canale del  $K^+$ ATP-dipendente costituisce un "set-point" nel controllo dell'attività elettrica della cellula  $\beta$ -pancreatica, la sua attività ha un impatto diretto nella regolazione della secrezione insulinica fisiologica e farmacologica in corso di iperinsulinismo, ma anche di diabete. Infatti l'inibizione farmacologica di questo canale attraverso le Sulfaniluree (Tolbutamide, Benclamide etc.) e altri farmaci anti diabetici come la Repaglinide e la Nateglinide, mimano l'azione fisiologica favorendo il rilascio insulinico. In maniera opposta, "openers" del canale del  $K^+$ , come ad esempio il Diazossido, prevenendo l'entrata di  $Ca^{2+}$  nella cellula attraverso i canali voltaggio dipendenti, portano ad un effetto iperglicemizzante (2). Se pure l'iniziale osservazione che l'iperinsulinismo congenito fosse una conseguenza di un alterato rilascio insulinico da parte delle cellule  $\beta$ -pancreatiche risalga a più di vent'anni fa (1), le basi molecolari sono state rese evidenti negli ultimi anni, anche se molti aspetti devono essere tuttora chiariti (2).



N ENGL J MED 350;18 WWW.NEJM.ORG APRIL 29, 2004

**Figura 1-** Rappresentazione schematica della  $\beta$ -cellula pancreatica, con illustrazione del ruolo del canale del  $K^+$  ATP-dipendente nella secrezione insulinica. Il glucosio entra nella  $\beta$ -cellula attraverso il suo trasportatore GLUT2, all'interno di questa, il glucosio metabolizzato porta ad una variazione nella concentrazione intracellulare di ATP che porta a sua volta alla chiusura del canale. La chiusura del canale del  $K^+$  porta alla depolarizzazione della membrana che attiva a sua volta i canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti. Si ha così un aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  che funge da trigger per l'esocitosi di granuli contenenti insulina. Le Sulfaniluree promuovono la secrezione di insulina legandosi direttamente alla subunità SUR1 del canale del  $K^+$  ATP-dipendente e inducendo la chiusura del canale. (Tratta da *New England Journal of Medicine* April 29, 2004; 350;18)



## ***La Patogenesi del CHI***

Recentemente, nella patogenesi dell'iperinsulinismo, si è arrivati a distinguere due grandi categorie:

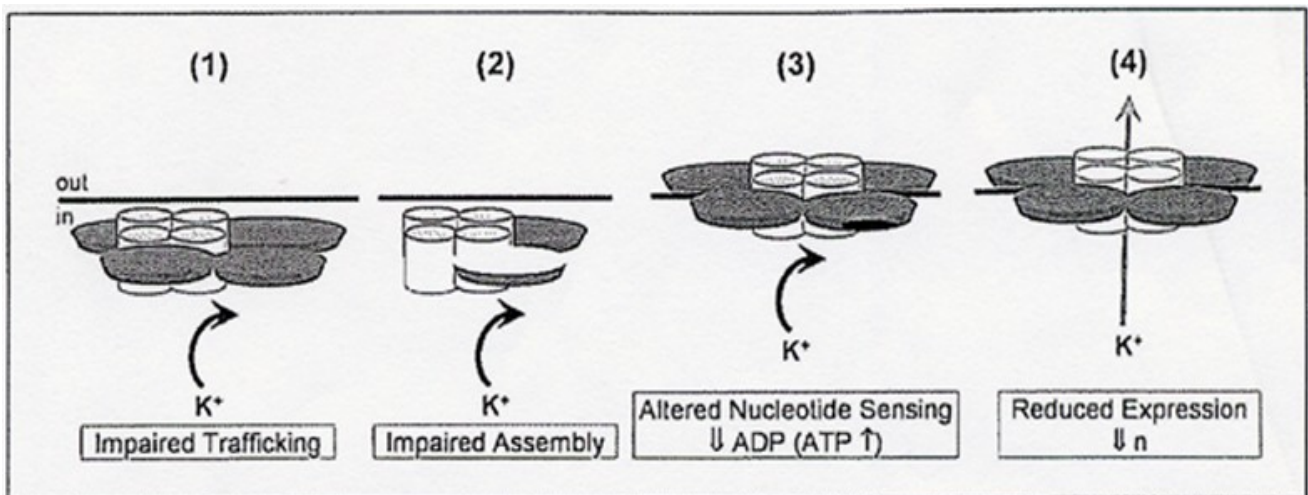
-“*channelopathies*”: difetti a carico dei geni che codificano per subunità del canale del K<sup>+</sup> ATP dipendente;

-“*metabolopathies*”: difetti a carico di geni implicati nell'omeostasi glucidica che inducono secondariamente una inappropriata attività o chiusura del canale del K<sup>+</sup>ATP dipendente, portando ad un alterato rilascio insulinico.(20)

### **Channelopathies e Metabolopathies**

#### ***Alterazioni a carico dei geni del canale del K<sup>+</sup>***

Più di 100 mutazioni sono state identificate a carico di ABCC8 e KCNJ11 fino ad oggi (20) . Per un buon numero di queste mutazioni è stato possibile dimostrare che queste danno origine a diverse alterazioni di canali del K<sup>+</sup> ricombinanti, che portano a difetti nel *fold*ing, nell'assemblaggio, nel *trafficking* della proteina, in alterazioni in entrambi i siti per i legami dei nucleotide, che porta ad alterazioni nello stato di apertura del canale o a una riduzione di espressione del canale stesso (figura 2)



**Figura 2**-Potenziali difetti a carico nel HI-KATP. (Tratto da *Hormone Research* 2004;61:270-288)

Tuttavia, nei pazienti valutati negli ultimi studi, in più del 50% delle forme diffuse (Di-HI) e del 30% delle forme focali (Fo-HI) non si è evidenziata una base genetica della patologia (21, 22); da ciò si desume che le nostre conoscenze sulla patogenesi dell'HI sono incomplete (5,9,20)

Dagli ultimi studi effettuati emerge che una *channelopathy* sia alla base di circa 85% dei pazienti che richiedono un intervento chirurgico, e che questa forma di HI ad esordio precoce possa essere distinta in tre categorie (20): **Channelopathy types 1**. Questo sottotipo è caratterizzato da un'ablazione completa del canale a livello delle cellule  $\beta$ -pancreatiche. Si riscontra in circa il 10% dei pazienti con Di-HI ed in circa il 55% dei Fo-HI. E' dovuta ad alterazioni a carico dei geni del canale del K<sup>+</sup> ATP-dipendente che portano ad un'alterato trafficking che risulta in un'inadeguata espressione a livello della superficie cellulare di SUR1, Kir6.2 o di entrambi.

La seconda categoria è rappresentata dal gruppo delle **Channelopathy types 2**: più del 60% delle Di-HI e del 45% delle Fo-HI presenta questo tipo di alterazioni. Si è visto che in meno del 5% questo gruppo di alterazioni portano ad una riduzione della densità dei canali del K<sup>+</sup> a livello della membrana, quello che si ritrova invece è una grave alterazione della sensibilità ai nucleotidi

intracellulari, in particolare all'ATP. La mutazione in SUR1 V187D, localizzata nella regione TDM0, porta ad una forma severa di HI ad insorgenza precoce ed è una delle due *founder mutations* che si associa a circa il 50% di HI nella popolazione Finlandese. Nelle  $\beta$ -cellule dei pazienti, più del 95% dei canali a livello della membrana sono persi e quelli residui risultano insensibili all'ADP ed al Diazossido (7,20). Questo sta ad indicare che il risultato della mutazione a carico della regione N-terminale di SUR1 può portare a conseguenze altrettanto severe come il troncamento a carico della regione C-terminale, e che questa mutazione mapperà in una regione di ABCC8 che codifica per NBFs.

Non tutti i casi di mutazioni causanti HI hanno una così stretta relazione genotipo-fenotipo. Nei pazienti Ebrei Ashkenazi, due mutazioni di ABCC8 ( $\Delta F1388$  e  $3992-9\text{ g>a}$ ) sembrano essere causa del 90% di tutti i casi (23,24). Il difetto a carico dell'introne 32 è associato a circa il 70% dei pazienti Ebrei Ashkenazi con HI ed è particolarmente interessante notare che i pazienti omozigoti presentano tra di loro una notevole variabilità fenotipica nell'espressione della malattia, infatti si va da casi di HI severo non responsivo ai trattamenti fino a pazienti con malattia lieve se non asintomatici. Numerosi fattori sono stati chiamati in causa per giustificare questa variabilità di espressione: azione di geni modulatori, fattori esogeni in grado di modificare il fenotipo ed una variabilità nella penetranza della mutazione (24). Infine, mutazioni di KCNJ11 sono cause di HI relativamente rare; fino ad oggi sono state descritte diverse mutazioni, come ad esempio Y12X, L147P, W91R, nessuna delle quali quando co-espressa con SUR1 ricombinante ha generato un canale normalmente funzionante (25,26,27)

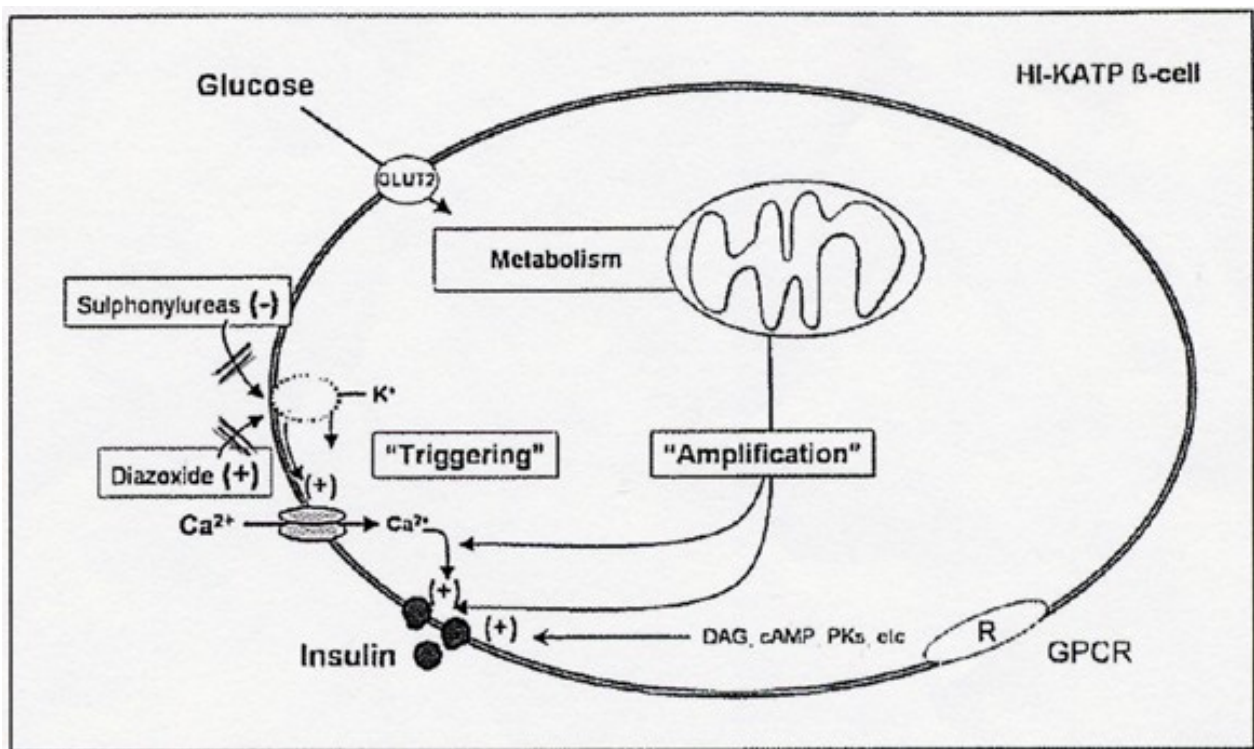
Si è visto che le *channelopathies* tipo 1 e tipo 2 sono implicate in circa l'85% dei pazienti con Di-HI che richiedono l'intervento chirurgico, suggerendo che circa il 15% delle anomalie alla base delle forme diffuse sono indipendenti dai difetti del canale del potassio fino ad ora conosciute. Vengono definite pertanto ***channelopathy type 3*** tutti quei pazienti che presentano una mutazione causante HI, non associata ai geni del canale del  $K^+$  finora conosciuti (20).

Da studi eseguiti su tessuti isolati da pazienti è stato possibile definire la relazione tra un'inappropriata secrezione insulinica e le *channelopathies* (28): nelle  $\beta$ -cellule pancreatiche, il canale del  $K^+$  ATP-dipendente svolge un ruolo cruciale nel mantenere il potenziale di membrana in condizioni di riposo. Come conseguenza della sua perdita, le  $\beta$ -cellule, presenti nei soggetti con HI, vanno incontro ad una spontanea depolarizzazione in assenza di metabolismo glucidico, e poiché il potenziale di membrana arriva alla soglia di attivazione dei canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio

dipendenti anche in condizioni di riposo, si ha quindi un ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula anche in condizioni di non stimolo (29). Poiché l'afflusso di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula è il fattore chiave per il rilascio di insulina in condizioni normali, un'incontrollata attività della *triggering pathway* è alla base dell'inappropriata secrezione insulinica durante l'ipoglicemia. Questa spiegazione è supportata dal fatto che questo potenziale d'azione a riposo può essere interrotto durante *voltage-clamp* o andando ad inibire direttamente i canali del  $\text{Ca}^{2+}$  con la nifedipina od il verapamil (29), ed inoltre dall'osservazione che le  $\beta$ -cellule nell'HI presentano valori più elevati di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare rispetto ai controlli (20,29). La perdita dei canali  $\text{K}^+$  ATP-dipendenti collegata all'afflusso di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula, può spiegare l'inefficienza della terapia medica in alcuni pazienti, poiché il Diazossido è incapace di ripolarizzare il potenziale di membrana cellulare ed interrompere il flusso di  $\text{Ca}^{2+}$  in assenza di canali del  $\text{K}^+$  su cui agire. Poiché il rilascio di insulina avviene non solo attraverso la *triggering pathway* ma anche attraverso l'*amplification pathway*, è stata studiata anche questa nelle  $\beta$ -cellule dei pazienti HI e si è visto che anche questa seconda via rimane attiva in queste cellule (Figura 3).

Indipendentemente dalla presenza dei canali al  $\text{K}^+$  ATP-dipendenti, nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche normali il glucosio (ma non la tolbutamide) è in grado di aumentare il rilascio insulinico sia in modo  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente, che  $\text{Ca}^{2+}$ -indipendente (15).

Nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche dei soggetti con HI, un pattern di amplificazione simile è descritto, e si è visto che il glucosio porta ad un aumento della protein chinasi C ed A, in assenza del  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare (20). Questi dati indicano che nell'HI, entrambe le parti ( $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente e  $\text{Ca}^{2+}$ -indipendente) dell'*amplification pathway* da parte del glucosio sono attive (Figura 3).



**Figura 3-** Controllo del rilascio insulinico nelle β-cellule con HI-KATP. (Tratto da *Hormone Research* 2004;61:270-288)

### **Metabopathies del canale del K<sup>+</sup> ATP-dipendente e l'iperinsulinismo**

Alcuni bambini con iperinsulinismo congenito presentano sintomi più sfumati rispetto all'ipoglicemia descritta in corso di HI-ATP, a volte gli episodi ipoglicemici possono essere sporadici, ed avvenire soprattutto dopo i pasti, inoltre altri pazienti possono presentare sintomi molto più avanti con l'età (30,31).

In questi casi l'iperinsulinismo è sempre responsivo alla terapia con il Diazossido, e rispecchia una modalità di trasmissione di tipo autosomico dominante e non è legato ad alterazioni a carico di ABCC8 e KCNJ11. Con gli anni è stata dimostrata un'associazione di queste forme con alterazioni a carico di altri geni, sempre implicati nel metabolismo glucidico, che danno origine ad un mal funzionamento del canale del K<sup>+</sup> che esita in diverse forme di iperinsulinismo: HI-GK, HI-GDH (o HI-HA), e HI-SCHAD (Tabella 1). Una nuova forma di iperinsulinismo, indotta dall'esercizio fisico è stata recentemente descritta, *Exercise induced Hyperinsulinism* (HI-EI) (32,33).

<i>Sindrome</i>	<i>Geni coinvolti</i>
<i>Difetto del canale del K<sup>+</sup> ATP-dipendente</i>	<b>ABCC8</b> (subunità SUR1 del canale OMIM 600509) <b>KCNJ11</b> ( subunità Kir6.2 del canale OMIM 600937)
<i>Hyperinsulinism-Hyperammonaemia syndrome</i>	<b>GLUD1</b> (mutazione attivante la Glutammato deidrogenasi OMIM 606762)
<i>Difetto della glucochinasi</i>	<b>GCK</b> (mutazione attivante la Glucochinasi OMIM #602485)
<i>Difetto della L-3-idroacil-CoA deidrogenasi</i>	<b>SCHAD</b> (OMIM +601609)
<i>Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type1b</i>	Phosphomannose isomerase deficiency (OMIM 162150)
<i>Prohormone convertase 1 deficiency (hyperproinsulinaemia)</i>	<b>PCSK1</b> (OMIM 162150)

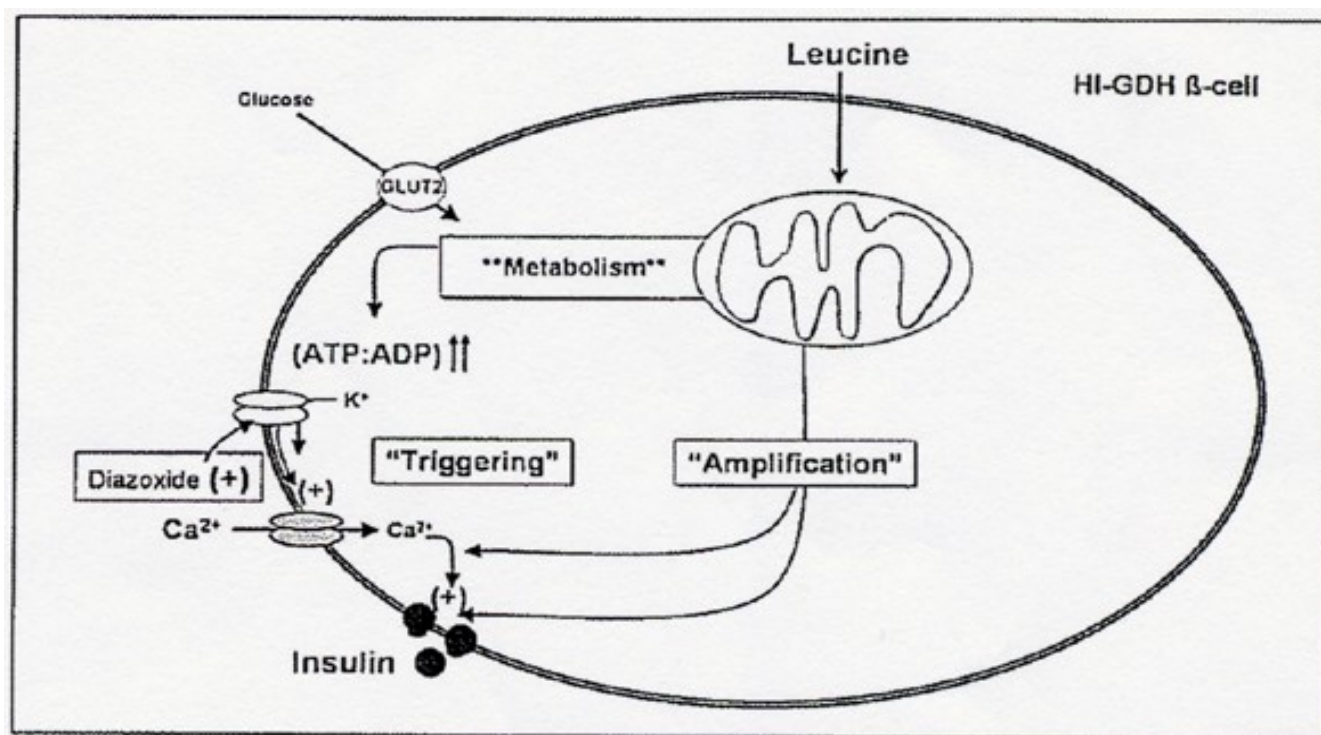
**TABELLA 1: Cause monogeniche di iperinsulinismo congenito**

**HI-GDH o HI-HA (Hyperinsulinism-Hyperammonaemia syndrome):** La seconda più comune forma di iperinsulinismo congenito è la “Hyperinsulinism-Hyperammonaemia syndrome” (HI-HA). L’associazione di iperammoniemia ed iperinsulinismo è causata da una mutazione “iperfunzionante”, attivante a carico del gene **GLUD1** (cromosoma 10q23.3) che codifica per l’enzima mitocondriale GDH (glucosio deidrogenasi) che viene ereditata in maniera autosomica dominante. Nelle β-cellule, la mutazione a carico di GDH porta ad un’alterazione del *binding domain* per il GTP, mancata inibizione dell’enzima, che risulta in un’inappropriata chiusura del canale del K<sup>+</sup> ATP-dipendente e continua secrezione insulinica (Figura 4). A livello epatico, l’eccessiva ossidazione del glutammato ad α-chetoglutarato produce ammoniaca ed impedisce che il glutammato sia trasformato in N-acetilglutammato, cofattore essenziale per l’eliminazione dell’ammoniaca attraverso il ciclo dell’urea mediata dall’enzima carbamil-fosfatasi. In questi

pazienti l'iperammoniemia è modesta, con concentrazioni attorno a 100-200 $\mu$ M/L, senza sintomi neurologici od altre conseguenza relative allo stato iperammoniemico e generalmente non correla con il grado di iperinsulinismo (31,34). La risposta marcata dei bambini con HI-GDH alla leucina suggerisce che alcuni pazienti, che prima erano stati descritti avere un "ipoglicemia sensibile alla leucina", possano essere invece portatori di mutazioni a carico di GDH dal momento che la leucina stimola la produzione di insulina agendo come induttore allosterico del GDH.

Numerosi casi sono stati descritti in letteratura dopo il primo descritto nel 1955, adesso si è capito che ci possono essere bambini con un iperinsulinismo sensibile alla leucina con patogenesi simile al HI-GDH, che però, a differenza di questa forma non presentano iperammoniemia.

In fine, l'HI-GDH può essere facilmente identificato attraverso l'analisi dell'ammoniemia o della risposta insulinica (AIR) alla somministrazione di leucina e trattato attraverso la somministrazione di Diazossido ed una dieta controllata (34).



**Figura 4-** Controllo del rilascio insulinico nelle  $\beta$ -cellule con GDH-KATP. (Tratto da *Hormone Research* 2004;61:270-288)

**L' HI-GK:** Un'altra mutazione "gain-of-function", ereditata sempre in modo autosomico dominante (OMIM #602485), che porta all'iperinsulinismo è il difetto nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche dell'enzima glucochinasi (GK) (cromosoma 7p15-p13) (30). Questa forma sembra essere piuttosto rara e di solito si accompagna ad un fenotipo clinico più sfumato, in cui la comparsa dell'ipoglicemia avviene più frequentemente dopo l'immediato periodo perinatale e dopo lo svezzamento. Recentemente però è stato descritto un caso di iperinsulinismo severo ad esordio neonatale associato a questa alterazione (35). La GK catalizza la conversione del glucosio in glucosio-6-fosfato nelle  $\beta$ -cellule, che costituisce la prima reazione enzimatica della glicolisi. Nel HI-GK, si ha un aumento dell'attività enzimatica di GK, aumento della glicolisi ed chiusura dei canali al  $K^+$  ATP-dipendenti e secrezione insulinica; questa chiusura porta quindi all'inappropriata risposta al glucosio, che esita nell'iperinsulinismo. Come per le altre *metabolopathies*, essendo conservata l'integrità dei canali al  $K^+$  ATP-dipendente, questi pazienti rispondono alla terapia con il Diazossido e non vanno incontro ad intervento chirurgico.

**L' HI-SCHAD:** Negli ultimi anni è stata descritta una forma di iperinsulinismo dovuta ad un difetto a carico della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, conseguente ad una alterazione dell'enzima L-3-idrossiacil-CoA deidrogenasi (SCHAD) che mappa sul cromosoma 4q24-25 .

Questo enzima catalizza la trasformazione NAD<sup>+</sup>-dipendente del L-3OH-acil-CoA in 3-Ketoacil-CoA, ed è espresso principalmente a livello del muscolo scheletrico e cardiaco, a livello del fegato e del pancreas. Una mutazione omozigote (C773T) nel gene codificante per SCHAD è stata descritta essere alla base di una forma di iperinsulinismo con ipoglicemia non chetotica (OMIM +601609) (36), questa forma può essere diagnosticata da un aumento inappropriato dei livelli di idrossibutircarnitina dovuti ad un'alterazione del metabolismo mitocondriale le cui basi non sono state ancora del tutto chiarite. Poiché questi pazienti risultano essere responsivi al Diazossido, suggerisce che o livelli elevati di ATP nella cellula sono causa di un'inadeguata chiusura dei canali al  $K^+$  ATP-dipendenti che esita in un aumento della secrezione insulinica, o che altri fattori (come ad esempio l'idrossibutircarnitina o derivati dell' L- $\beta$ -idrossibutir-CoA) modulino i canali al  $K^+$  ATP-dipendenti e compromettano il meccanismo di depolarizzazione della cellula (37).

**L' HI-EI: Exercise induced Hyperinsulinism:** Una nuova forma di ipoglicemia iperinsulinemica è stata descritta negli ultimi anni, si riscontra durante l'esercizio fisico intenso e si pensa sia dovuta ad un picco di rilascio di insulina che predispone questi pazienti all'ipoglicemia. Questa forma è



stata descritta in persone che non presentano ipoglicemie a digiuno e fino ad oggi, non è stata descritta nel periodo neonatale (32,33). Poiché studi precedenti, effettuati in vitro, hanno dimostrato che nel soggetto normale il rilascio insulinico da parte delle  $\beta$ -cellule pancreatiche non è stimolato dalla somministrazione esogena di lattato e piruvato per la mancanza di trasportatori sufficienti per queste due sostanze, è stato suggerito che alla base della patogenesi dell'HI-EI vi sia un'anormale risposta all'aumento dei livelli circolanti di lattato e piruvato durante l'esercizio fisico. In uno studio di follow-up di 10 casi di HI-EI appartenenti a due famiglie differenti, è stato visto che una forma di HI-EI a trasmissione autosomica dominante è associata ad un anormale trasporto o metabolismo del piruvato nelle  $\beta$ -cellule pancreatiche, la base genetica non è stata ancora chiarita, ma è stata esclusa un'associazione con difetti nei *monocarboxylate transporter genes* MCT1-MCT8 (33).

Altri due difetti genetici sono stati trovati essere associati con l'ipoglicemia iperinsulinemica: *Phosphomannose isomerase deficiency* (OMIM #602579) e la *Prohormone convertase 1 (PC1) deficiency* (PCSK1, OMIM 162150) (37)

La prima alterazione viene riscontrata nella *Carbohydrate-deficient glycoprotein sindrome type 1* che si è visto essere associata a una forma di ipoglicemia iperinsulinemica dell'infanzia (36,37) anche se la sua patogenesi rimane ancora oscura. Altri elementi caratterizzanti la presentazione clinica sono l'epatomegalia, la diarrea ed una enteropatia protido-disperdente. Questa forma rimane una diagnosi importante in quanto è suscettibile al trattamento con mannosio.

### **Forme Sindromiche**

Per completezza si ricorda che una serie di sindromi, che si presentano nell'infanzia e si accompagnano a ipoglicemia iperinsulinemica.

*Beckwith-Wiedeman syndrome* (BWS, OMIM #130650) è una sindrome da iper-accrescimento congenito a fenotipo eterogeneo che presenta una prevalenza tra 1: 10.000-15.000 nati vivi. Questa patologia si associa ad una serie di caratteristiche fenotipiche patognomoniche quali: macroglossia, esoftalmo, microcefalia, visceromegalia, la presenza di rilevatezze caratteristiche a livello dei lobi auricolari, nevi facciali, emiipertrofia, alterazioni renali e meno comunemente (<10% casi) a malformazioni cardiache, malrotazione intestinale e ritardo mentale. Si è visto inoltre che questi bambini presentano una predisposizione allo sviluppo di tumori, compreso il tumore di Wilms, l'epatoblastoma, il carcinoma surrenalico e il rabdomiosarcoma (38). In circa il

50% di questi bambini si riscontra ipoglicemia associata ad iperinsulinismo, che in alcuni casi si presenta lieve se non asintomatica, mentre in altri può essere severa e di difficile gestione. È stato stimato che circa l'85% dei casi di BWS originano da una mutazione spontanea mentre il 15% abbia una trasmissione di tipo autosomico dominante. In circa l'80% dei pazienti sono state trovate alterazioni a carico dell'imprinting domain del cromosoma 11p15, geni che mappano in quest'area includono p57kip2 (CDKN1C) il gene per IGF2, il gene dell'insulina, il gene H19, ed il gene per il canale del K<sup>+</sup> voltaggio-dipendente KvLQT1 (gene KCNQ1), che è localizzato vicino al locus genetico dei geni per il canale del K<sup>+</sup> ATP-dipendente β-cellulare (ABCC8 e KCNJ11). Fino ad ora l'assenza di dati funzionali non ha permesso di chiarire il meccanismo patogenetico alla base dell'iperinsulinismo che accompagna la BWS. Poiché molti pazienti con BWS sono responsivi al trattamento con Diazossido e presentano risposte alla leucina normali, sembra difficile che una disfunzione dei canali del K<sup>+</sup> ATP-dipendenti sia una causa comune dell'iperinsulinismo. Tuttavia poiché sono stati descritti casi di iperinsulinismo resistente ai trattamenti con il Diazossido, si può pensare che la patogenesi sia multifattoriale (37).

La Sotos syndrome (*celebral gigantism* OMIM#117550), come la BWS, è una sindrome da iperaccrecimento che è stata associata con l'ipoglicemia iperinsulinemica. La causa principale di questa sindrome risiede in aploinsufficienza del *receptor SET-domain-containing protein* (NDS1). Recenti studi però hanno dimostrato che alcuni individui con questa sindrome presentano alterazioni a livello cromosomico sulla regione 11p15 e che alcuni individui con BWS presentano mutazioni a carico di NDS1, suggerendo che NDS1 sia coinvolto nell'imprinting della regione 11p15 (38 bis).

## **Forme diffuse e Forme focali: aspetti istopatologici e correlazione con la genetica**

Difetti che portano ad una perdita di funzione a livello dei geni codificanti le subunità per il canale del K<sup>+</sup> sono note per causare un severo iperinsulinismo ad esordio precoce nei neonati ( CHI-KATP), che rappresenta la causa più frequente di iperinsulinismo congenito (39,40).

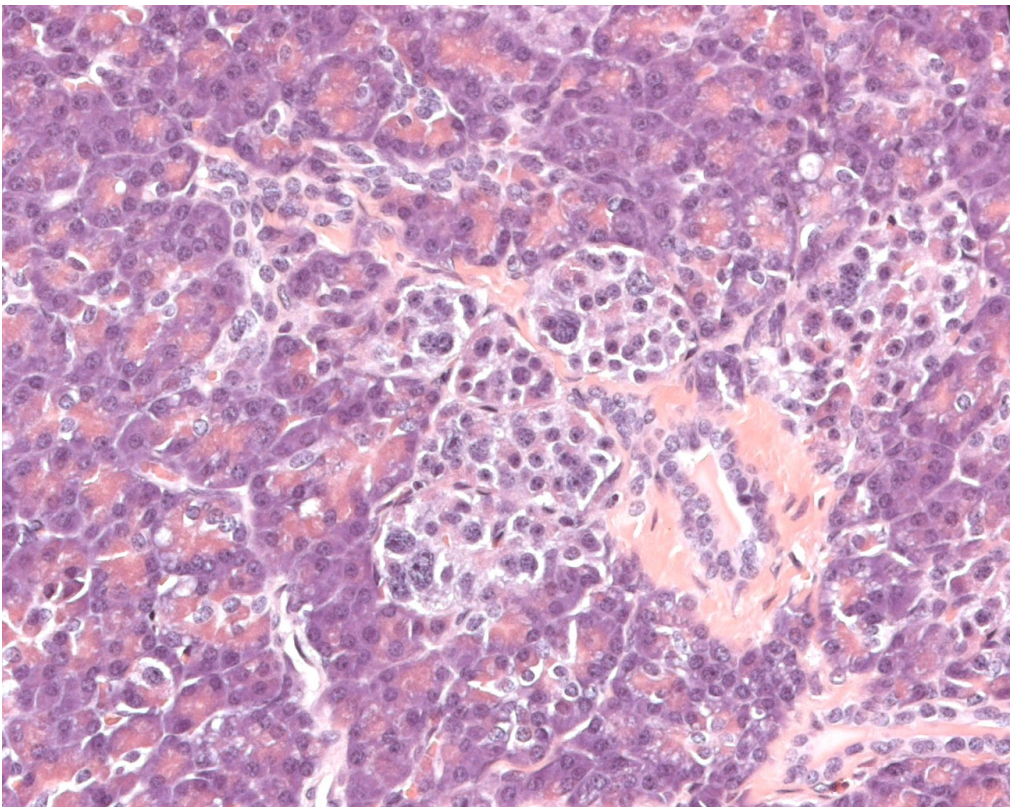
L'iperinsulinismo ad esordio precoce nei neonati si può manifestare come una malattia diffusa (**Di-HI**) o come un'iperplasia adenomatosa localizzata, una forma focale (**Fo-HI**). Dagli studi effettuati negli ultimi anni si è evidenziato che entrambe le forme, diffuse e focali, hanno lo stesso locus genetico (9). Il gene codificante per SUR1, ABCC8, comprende 39 esoni ed è situato vicino al gene per Kir6.2, KCNJ11, costituito da un unico esone. ABCC8 e KCNJ11 sono separati da 4,5 paia di Kilobasi e nel genoma umano sono localizzati a livello del braccio corto del cromosoma 11 (Ch11p15) (9,21). Sebbene siano state descritte delle mutazioni di tipo autosomico dominante (41), la forma diffusa origina prevalentemente da una mutazione a livello dei geni codificanti il canale del K<sup>+</sup> (ABCC8 e/o KCNJ11) a trasmissione autosomica recessiva (9). Questa forma colpisce le isole di Langerhans di tutto il pancreas, e si presenta istologicamente con  $\beta$ -cellule caratterizzate da un nucleo grande ed a volte ipercromatico, ed abbondante citoplasma (42) (Figura 5). Fino al 1997, si pensava che Di-Hi fosse la causa principale di iperinsulinismo congenito, mentre adesso si sa che le forme focali, Fo-HI, sono la causa principale di HI-ATP, si arriva a percentuali del 70% dagli ultimi studi (43).

Le forme focali (Fo-HI) invece, originano da una mutazione con trasmissione di tipo non mendeliano. Infatti, queste sono dovute al verificarsi di due eventi concomitanti: una mutazione germinale ereditata dal padre (a carico di ABCC8 o KCNJ11), e la perdita di una regione di 11p15 dell'allele materno a livello somatico (44). Il risultato è una perdita di eterozigosi (*Loss of Heterozygosity*, LOH) a livello delle aree di adenomatosi iperplastica focale a carico del pancreas, con espressione dell'allele patologico paterno mutato in emizigosi. Queste lesioni originano da espressione sbilanciata dei *tumor suppressor genes* (H19 e p57<sup>kip2</sup>) con imprinting materno ed il gene per l' *insulin-like growth factor 2* di origine paterna. Da un punto di vista istopatologico, le forme focali appaiono come delle zone di proliferazione endocrina isolata nel contesto di un tessuto pancreatico normale. A differenza della forma diffusa, le isole pancreatiche al di fuori

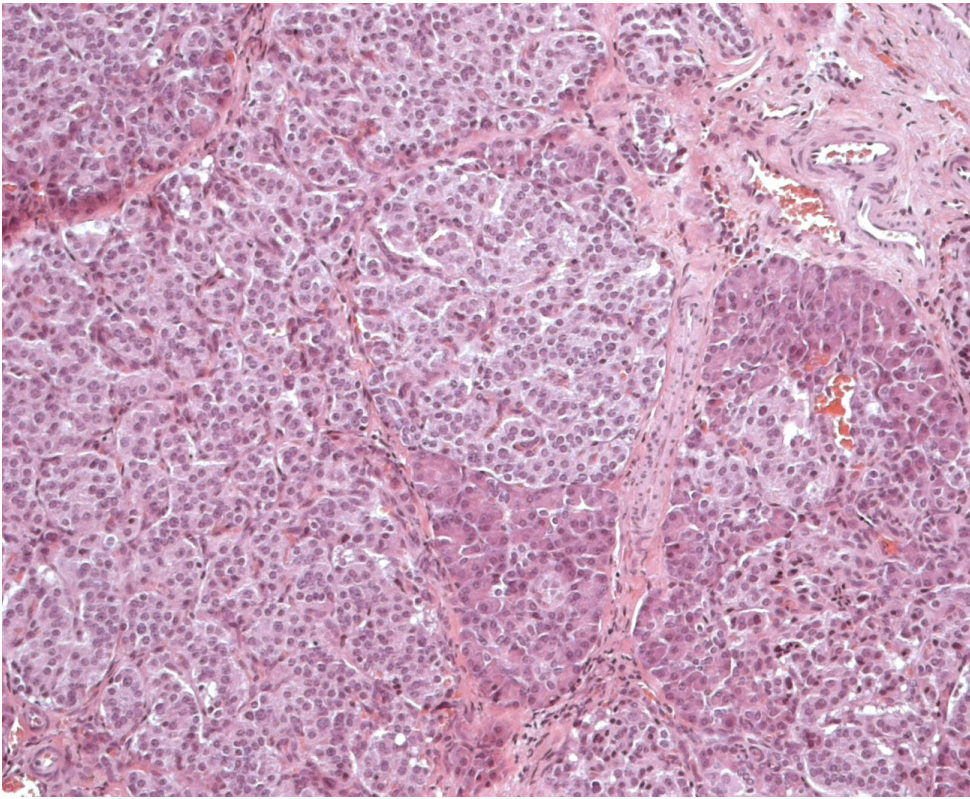
delle lesioni focali non presentano ingrandimento dei nuclei, ed a volte possono presentare nuclei piccoli, vicini gli uni agli altri (*“resting morfology”*) (42) (Figure 6,7,8).

Una piccola parte di pazienti presentano un'istopatologia atipica, con un'eterogeneità a livello delle isole pancreatiche caratterizzata da zone iperfunzionanti e zone ipofunzionanti. Questa variante, definita mosaicismo istologico, è tuttavia rara nell'iperinsulinismo ad esordio neonatale e non è stata accertata una LOH a carico delle zone iperfunzionanti, né un'alterazione a carico dei geni del canale del  $K^+$  (37).

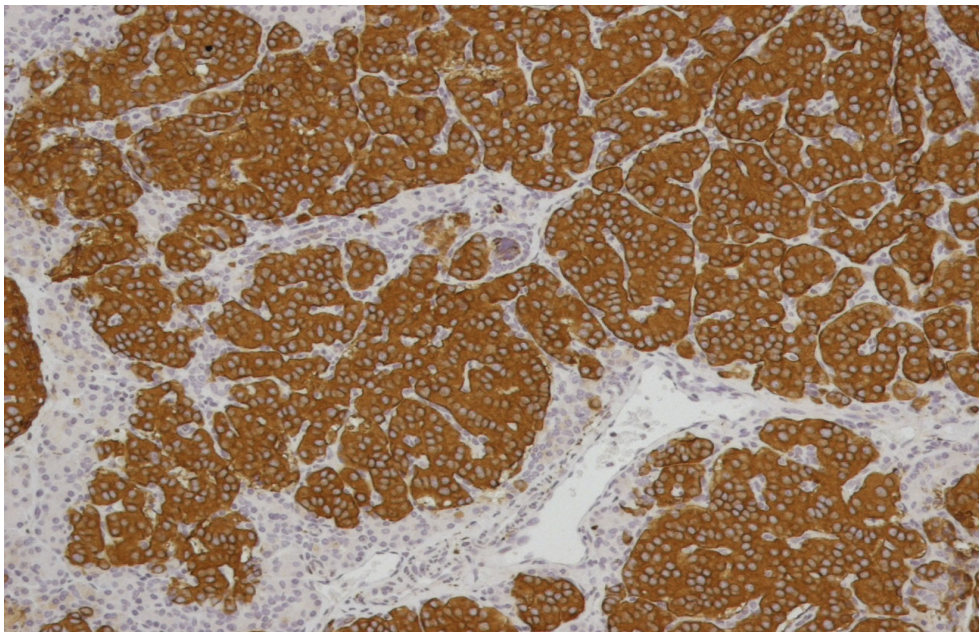
La distinzione nelle due forme principali, focale o diffusa, riveste una valenza clinica importante. Pazienti con una forma focale infatti, possono essere curati con una pancreatectomia parziale, che evita di candidare questi bambini a diventare diabetici o ad intraprendere una terapia sostitutiva con enzimi pancreatici. Infatti in caso di Di-HI il trattamento prevede un'asportazione del 95% del tessuto pancreatico. Uno dei più grandi ostacoli tuttora presenti è riuscire a caratterizzare preoperatoriamente i pazienti. Nei casi non responsivi alla terapia farmacologica, la caratterizzazione istologica oggi è mandataria (42,43)



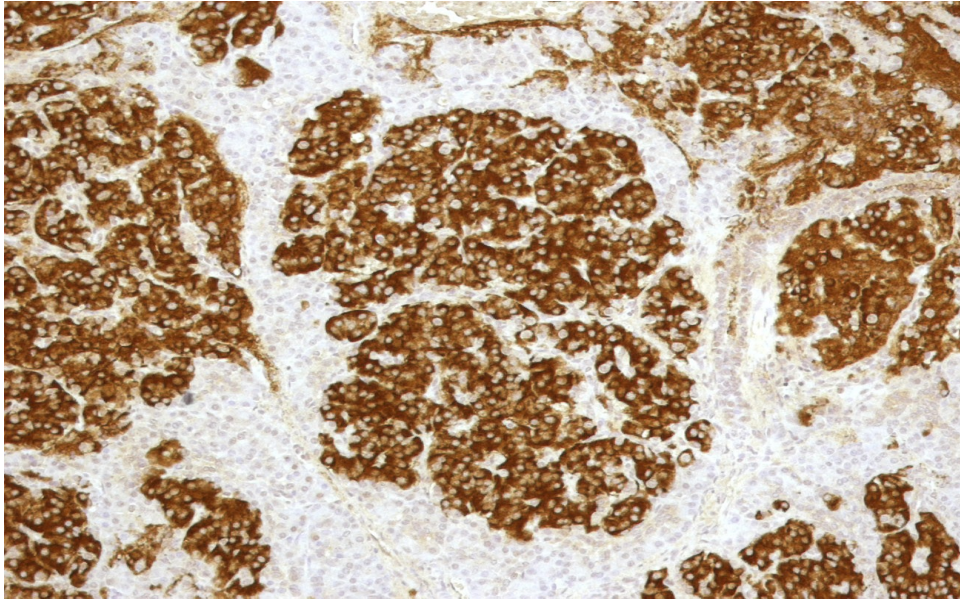
**Figura 5** – Nesidioblastosi diffusa. Si evidenzia la peculiare anisocariosi e la focale kariomegalia di alcuni elementi cellulari endocrini. (Ematossilina-eosina, 200x).



**Figura 6** – Nesidioblastosi focale. Le cellule endocrine sono organizzate in ampi aggregati di forma nodulare, con sostituzione pressoché completa della locale quota di acini esocrini. (Ematossilina-eosina, 100x).



**Figura 7** – Nesidioblastosi focale- Immunoistochimica per Sinaptofisina. La diffusa ed omogenea positività per sinaptofisina evidenzia la struttura degli aggregati di cellule endocrine, quantitativamente prevalenti nelle aree nesidioblastosiche. (Sinaptofisina, 100x).



**Figura 8** – Nesidioblastosi focale- Immunoistochimica per Insulina. La prevalente positività per insulina rivela che la quota cellulare produttrice l'ormone supera il 60-70% della massa totale endocrina nelle aree nodulari. (Insulina, 100x).

## La clinica

L'ipoglicemia è il sintomo principale dell'HI e espone ad alto rischio di convulsioni e danno cerebrale. I sintomi che rivelano lo stato ipoglicemico sono vari e dipendono non solo dal grado di severità dell'ipoglicemia ma anche dall'età del paziente e possono essere sfumati e riscontrati da controlli routinari glicemici oppure gravi da portare al coma o allo stato di male epilettico. **Durante il periodo neonatale** infatti l'ipoglicemia severa può manifestarsi con convulsioni nella metà dei pazienti. La maggior parte dei neonati affetti da HI sono macrosomici e nel 30% dei casi nati da taglio cesareo. L'ipoglicemia è permanente sia pre prandiale che post prandiale. La media di glucosio endovenoso richiesto per mantenere concentrazioni plasmatiche intorno a 3 mmol/L può arrivare anche a 17 mg/Kg/min. Frequentemente riscontrata anche una modesta epatomegalia. Durante l'ipoglicemia i livelli di cortisolo qualche volta risultano bassi, pur non essendoci un deficit di cortisolo, e si correggono spontaneamente in qualche settimana. L'ipoglicemia neonatale quando severa o prolungata predispone ad un basso outcome neurologico. Di solito non è responsiva al Diazossido eccetto i casi in cui l'iperinsulinismo è transitorio e indotto dallo stress perinatale, oppure si tratti di iperinsulinismo sindromico o correlato a mutazioni del HNF4A e del GLUD1. **Durante il periodo post natale**, l'ipoglicemia può essere diagnosticata tra il primo e il secondo mese di vita, nella metà circa dei pazienti, a volte anche più tardi, in qualche caso si tratta di una diagnosi tardiva più che di un esordio tardivo. I sintomi che si possono presentare prima del compimento del primo anno di vita sono convulsioni, episodi lipotimici o di eccitabilità. Dopo il primo anno di vita i sintomi sono tipici dello stato ipoglicemico: pallore, astenia, tachicardia, sudorazione, convulsione. La macrosomia alla nascita è spesso riportata anamnesticamente. Le caratteristiche cliniche dell'ipoglicemia sono simili ma il tasso di glucosio endovenoso richiesto per mantenere normale la glicemia è lievemente inferiore a quanto detto precedentemente aggirandosi intorno a 12-13 mg/kg/min nei bambini in cui la diagnosi è stata posta prima del compimento dell'anno d'età. **L'HI sindromico** è solitamente responsivo al trattamento con Diazossido. Il riscontro di ipoglicemia è spesso precoce, alla nascita, e la presenza di note dismorfiche richiede un esame obiettivo attento e sistematico associato a test diagnostici che consentono di postulare diagnosi nel più breve tempo possibile. Al contrario, una ipoglicemia asintomatica può anche essere individuata durante esami di follow up in pazienti seguiti per altre sindromi.(3)

La difficoltà nel riconoscere e trattare prontamente l'ipoglicemia nel neonato o nel lattante può determinare danni cerebrali irreversibili con successivo ritardo dello sviluppo psicomotorio, ritardo mentale, epilessia. Sono state descritte complicanze neurologiche nel 25-50% dei pazienti (3,28). Obiettivo della gestione del bambino con CHI è quindi una diagnosi precoce, una pronta istituzione della terapia e un adeguato follow-up al fine di prevenire i danni cerebrali e garantire uno sviluppo psico-motorio normale.



## La diagnosi

La valutazione laboratoristica dell'ipoglicemia si basa sulla determinazione di un certo numero di parametri metabolici che possono essere indicativi del corretto funzionamento o meno dei diversi meccanismi deputati al mantenimento dell'omeostasi glucidica; spesso tali parametri sono diagnostici solo se valutati durante la crisi ipoglicemica. E' di fondamentale importanza ottenere un campione di sangue al momento dell'ipoglicemia, per la determinazione di: PH ematico, glicemia, insulina, lattato, 3-idrossi-butirrato, GH, cortisolo. Nelle urine verrà ricercata la presenza di chetoni, sostanze riducenti e verrà studiata l'aciduria dicarbossilica. Altri esami utili per la diagnosi differenziale sono: acidi grassi liberi, glicerolo, aminoacidi, piruvato, carnitina libera ed esterificata c-peptide, glucagone (45). Nel caso non fosse stato possibile valutare il quadro metabolico in corso di ipoglicemia è necessario ricorrere al test del digiuno. Il test al glucagone è di indubbia utilità per valutare la riserva epatica di glicogeno e porre diagnosi differenziale tra forme dovute a glicogenosi, difetti della gluconeogenesi, ipoglicemia chetotica idiopatica e CHI. Poiché la prognosi, riguardo i danni neurologici che possono avere questi bambini, è correlata alla severità ed alla durata soprattutto dei primi episodi ipoglicemici, questo implica la necessità di una diagnosi rapida di queste condizioni e di un *management* ottimale. Oggi vi è accordo generale su quali siano i **criteri diagnostici per CHI**:

- glicemia di laboratorio < 50 mg/dl;
- valori di insulinemia e di c-peptide al momento dell'ipoglicemia non soppressi (con valore di glicemia di 40 mg/dl l'insulinemia dovrebbe essere < 5  $\mu$ U/ml, nei soggetti iperinsulinemici è superiore a 10  $\mu$ U/ml);
- assenza di chetoni durante l'ipoglicemia;
- livelli inappropriatamente bassi di acidi grassi liberi;
- necessità di apporto di glucosio maggiore di 10 mg/kg/min per mantenere livelli glicemici > 50 mg/dl;
- incremento della glicemia  $\geq$  40 mg/dl dopo somministrazione di glucagone; assenza di chetonuria (3).

Posta diagnosi biochimico-metabolica di CHI, oggi è indicato cercare conferma mediante l'esame genetico; quindi andranno ricercate mutazioni dei geni SUR1, KYR 6.2, GLUD1, GCK, HADHSC, HNF4A, SLC16A1, pur tenendo presente che ad oggi solo nel 50% dei casi si individua una mutazione.

Altra tappa fondamentale dell'iter diagnostico è la distinzione tra forma focale e forma diffusa.

### ***Metodi per differenziare Fo-HI dal Di-HI***

Il metodo che rappresenta il gold standard per differenziare le due forme di HI è costituito dall'analisi istologica di sezioni intraoperatorie. Questa necessita l'analisi da parte di Anatomicopatologi esperti e può essere realizzata solo presso Centri di riferimento per questa patologia. Le lesioni focali sono spesso non visibili alla laparoscopia, e si evince la necessità di sviluppare diverse strategie preoperatorie che permettano la distinzione dei pazienti, poiché le metodologie diagnostiche convenzionali quali l'ecografia, la scintigrafia con Octreotide e la risonanza magnetica sono normalmente non dirimenti.

### ***Metodi invasivi***

Il sampling venoso pancreatico percutaneo è un metodo provato ed utile per differenziare Fo-HI da Di-HI e localizzare le lesioni focali preoperatoriamente (46). Questo metodo consiste nella cateterizzazione per via transepatica delle vene pancreatiche (Transhepatic Portal Venous insulin Sampling, THPVS), nel prelievo di sangue da ognuna di esse per il dosaggio della glicemia e della insulinemia e nella dimostrazione della presenza di aree di secrezione di alti livelli di insulina accompagnate da bassi livelli di glicemia. Questo prevede che i prelievi vengano fatti a livello delle piccole vene pancreatiche, perché prelievi solo a livello dei vasi maggiori potrebbero portare a risultati non significativi. Questo metodo prevede che la terapia venga sospesa nei giorni precedenti, in particolare 5 giorni prima per il DZ e 36 h prima l'Octreotide, e che durante la procedura la glicemia venga mantenuta a concentrazioni < 3.0 mmol/l. Come risultato si potrà verificare o l'esistenza di una disregolazione globale della secrezione di insulina (Di-HI) o invece una o più aree affette (Fo-HI); purtroppo a volte la procedura può anche non essere informativa.

Dati di letteratura su questo tipo di procedura riportano infatti percentuali di falsi positivi per Fo-HI nella THPVS del 15%, un 5% di procedure non conclusive ed un 5% in cui si sospetta una Fo-HI ma non si riesce a localizzare (3) .

Quando il sampling suggerisce la presenza di una forma focale, ma l'area affetta non viene localizzata con precisione, può essere attuato il test di stimolazione con  $\text{Ca}^{2+}$  per via intraarteriosa (ASVS). Il  $\text{Ca}^{2+}$  viene iniettato selettivamente a livello delle arterie gastroduodenale, mesenterica superiore e splenica per stimolare la secrezione insulinica: un aumento dei livelli di insulina, pari al doppio del basale o anche superiore, da una singola regione del pancreas viene ritenuto indicativo di malattia focale localizzata nel territorio dell'arteria selezionata.

Si è visto che questo test è valido per localizzare le forme focali, la percentuale in cui risulta informativo si avvicina a quella del sampling. L'ASVS, non distingue definitivamente tra le forme focali e quelle diffuse, sebbene abbia la capacità di identificare la zona della lesione focale nel 73% dei casi.

IL THPVS è una procedura tecnicamente non semplice e rischia di esporre i piccoli pazienti ad ipoglicemie prolungate, pertanto metodi validi alternativi per distinguere le due forme preoperatoriamente sono stati ricercati ricercati. (47,48)

### ***Metodi non invasivi***

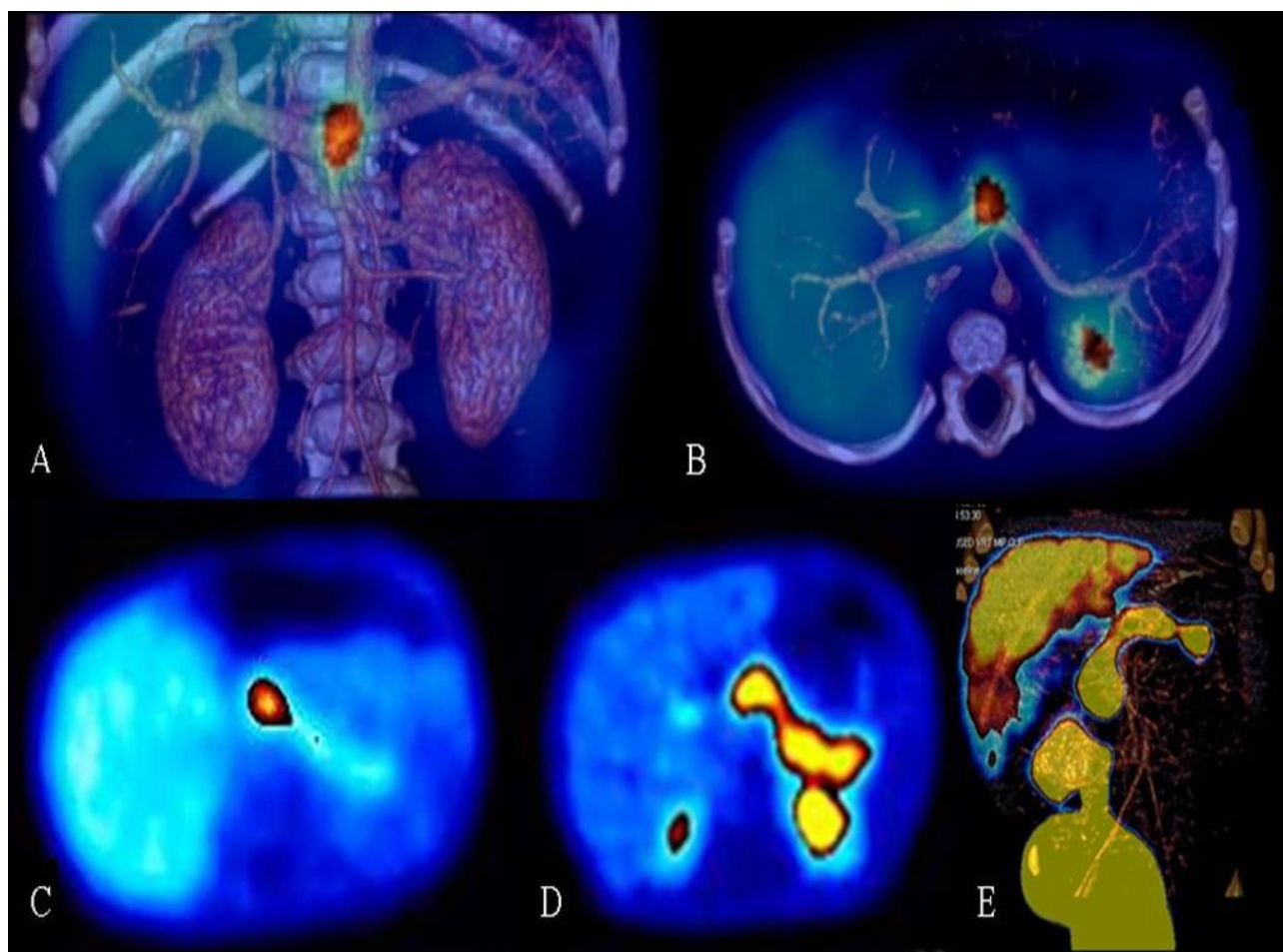
Per lo screening delle forme focali sono stati proposti diversi test non invasivi, come ad esempio la risposta insulinica acuta (AIR) all'infusione endovenosa della Tolbutamide (antagonista dei canali del  $\text{K}^+$  ATP-dipendenti). Il razionale su cui si basa questo test risiede nel fatto che il pancreas normale (quiescente), che si ritrova nelle Fo-HI al di fuori delle lesioni, può essere ancora stimolato a produrre insulina per azione del farmaco, diversamente da quanto ci si attende di osservare nelle forme in cui è affetto tutto il tessuto pancreatico. Inizialmente, dagli studi effettuati in letteratura si evinceva come bambini che presentavano un Di-HI associato alle due mutazioni più comuni a carico di SUR, presentassero un'anormale secrezione insulinica in risposta ai test farmacologici fin qui descritti. Questo comportava una eccessiva risposta positiva dell'AIR al  $\text{Ca}^{2+}$ , un'anomala risposta negativa dell'AIR dopo Tolbutamide. Uno studio recente, tuttavia, effettuato su bambini che sono andati incontro ad intervento chirurgico dei quali è pertanto nota l'istologia, ha evidenziato che il test alla Tolbutamide è quasi sempre positivo (90%) per le lesioni focali, ma contrariamente alle aspettative, anche molti pazienti (più del 50%) con una forma diffusa hanno presentato una risposta positiva. (49)

Questo reperto è stato messo in relazione con l'osservazione che alcune mutazioni recessive a carico dei geni del canale del K<sup>+</sup> ATP-dipendente appaiono giustificare la coesistenza di una mancata risposta al DZ e della capacità dei canali di essere stimolati dalla Tolbutamide.(3, 6)

Da quanto riferito si evince come si debba riconsiderare l'effettiva capacità dei test di AIR per distinguere i due tipi di forme di malattia.

Recentemente questi metodi sono stati soppiantati dalla TAC/PET con 18-Fluoro-DOPA. La PET (**Positron Emission Tomography**) viene comunemente utilizzata per identificare tumori neuroendocrini funzionanti e si è ipotizzato di utilizzarla per identificare le lesioni nelle forme di Fo-HI utilizzando la 18F-Di-idrossi-fenilalanina, un aminoacido marcato con F18. (47, 49 bis) La capacità di captare la L-DOPA e di trasformarla in dopamina è correlata con l'attività della decarbossilasi degli aminoacidi aromatici e risulta aumentata nelle aree pancreatiche interessate da iperfunzione, rispetto alle aree con normale funzionamento. I pazienti sono tenuti a digiuno per almeno 6 h prima dello studio PET. La captazione del 18F-fluoro-L-DOPA non è influenzata dalla somministrazione di octreotide e / o diazossido, pertanto lo studio PET può essere eseguito senza interrompere questi farmaci. Al contrario, il glucagone, interferendo con la  $\beta$ -cellula, e probabilmente anche con l'attività dell'enzima decarbossilasi, deve essere sospeso un giorno prima dell'esame PET. La durata dell'indagine PET è di circa 30 minuti, e di solito viene eseguita sotto una lieve sedazione. I pazienti sono posti in posizione supina con un allineamento laser tridimensionale. Al fine di garantire la posizione ottimale dello scanner e per evitare artefatti da movimento, i bambini devono essere comodamente immobilizzati durante l'acquisizione delle immagini. La tecnica consiste nella iniezione endovenosa di 18 F L-DOPA (dose media di radioattività iniettata 4,2 MBq / kg di peso corporeo  $\pm$  1.0 SDS) e nell'esecuzione dopo 45- 65 minuti dall'iniezione del radiotracciante di una scansione PET toraco-addominale (con modalità di acquisizione tridimensionale). Le immagini ricostruite devono essere valutate in un display 3D con vista assiale, coronale e sagittale per visualizzare il pancreas, che presenta sempre un alto assorbimento di 18F-fluoro-L-DOPA e distinguerlo dagli organi circostanti nell'addome. Le immagini PET mostrano che la maggior parte della radioattività iniettata si trova nei reni e la vescica. Di conseguenza, la radioattività elevata in questi organi, in particolare nel rene sinistro, potrebbe aumentare la difficoltà di individuare forme focali localizzate nella coda del pancreas quando le immagini vengono interpretati con la sola PET. Inoltre, in alcuni pazienti, un accumulo di radiotracciante è fisiologico nel fegato, colecisti, vie biliari, e nel duodeno. Tuttavia, questo assorbimento variabile può essere distinto dall' assorbimento 'non

fisiologico' del pancreas. La localizzazione di forme focali può essere migliorata dalla angiografia TC-PET. Infatti, il radiotracciante sarà situato con riferimento alla posizione dei vasi mesenterici splenici, superiore ed inferiore, e/o della vena porta. La metodica si è rivelata estremamente sensibile, oltre che poco invasiva, e permette al chirurgo di eseguire una resezione limitata alla zona interessata. (35, 36) (Figura 9). La PET con 18F-fluoro-L-DOPA è consigliata a tutti gli HI resistenti al diazossido per distinguere forme focali da forme diffuse ma non deve essere eseguita sotto il primo mese di vita, per escludere i pazienti con HI transitorio, o in pazienti con una forma sospetta diffusa geneticamente provata (HI / HA sindrome, HI sindromiche e mutazioni in GCK, SLC16A1, HNF4A e HADH ). Per concludere, sia la PET che la genetica forniscono informazioni importanti circa la forma (focale o diffusa) di HI, e quindi danno l'indicazione al tipo di intervento chirurgico (pancreasectomia parziale o subtotale). (3, 50, J.-B. Arnoux et al. / Early Human Development (2010))

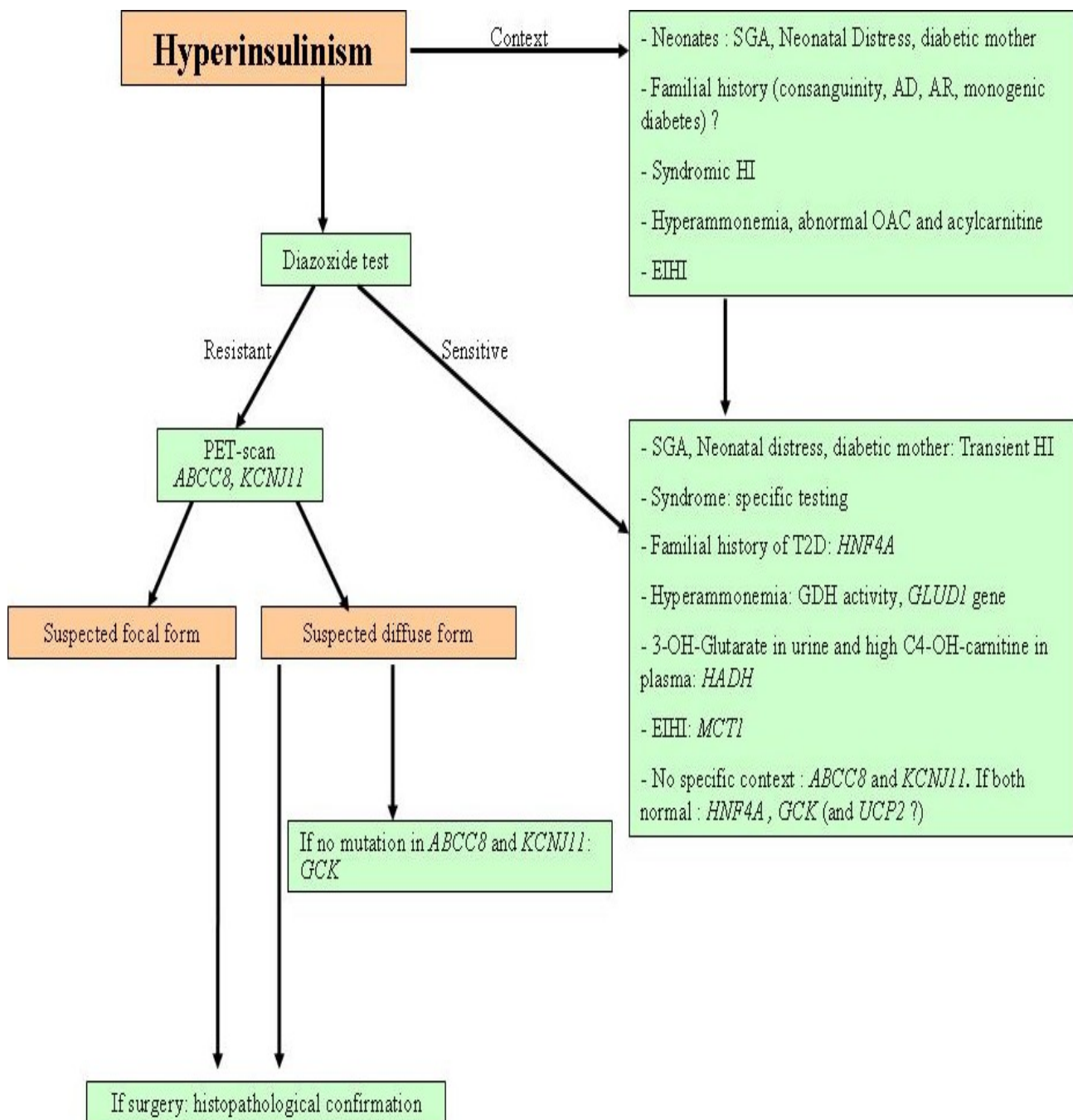


**Figure 9.** Abdominal 18F-fluoro-L-DOPA PET-scan imaging in HI. Focal form (A, B, C): PET-scan localizes accurately the focal lesion. A: Anterior view of a 3 dimensions CT-scan reconstruction fused with PET imaging. B: Transversal view (Fusion PET&CT) of the same patient with a focal form. The pancreatic uptake of the radiotracer is almost exclusively located at the head of the pancreas with a near-complete silencing of the rest of the pancreatic tissue (C: Transversal PET imaging). In a suspected diffuse form, the uptake of the radiotracer appears in the whole pancreas (D: PET, transversal view; E: Pet and 3D CT fusion). Fluoro-

DOPA is excreted in the kidneys and the bile, so that liver (C, D, E), kidneys (D, E), ureter, bladder and diaper (E) appear on the PET imaging.

Da tutto ciò finora esposto si capisce come la gestione di questi piccoli pazienti richieda l'associazione di più competenze, ed un team che preveda la presenza di più tipi di specialisti tra cui neonatologi-pediatri esperti, genetisti, biologi, anatomo-patologi, radiologi, chirurghi ed anestesisti.

**Figura 10-** Approccio generale nella gestione dell'iperinsulinismo.



**Figura 10.** Diagnostic tree for HI. AD: Autosomal Dominant; AR: Autosomal Recessive; MODY: Maturity Onset Diabetes of the Youth; HI: Hyperinsulinism; OAC: Organic Acid Chromatography; EIHI: Exercise-Induced HyperInsulinism; SGA: Small for gestational age. T2D: Type 2 diabetes. (tratto Arnoux et al. Orphanet Journal of Rare Diseases 2011, 6:63 )

## La terapia: trattamento farmacologico e trattamento chirurgico

Un'ipoglicemia acuta grave è un'urgenza medica, e il trattamento consiste nel fare risalire in tempi brevi i livelli glicemici e stabilizzarli; questo comporta l'infusione per via endovenosa di glucosio al 10% alla dose di 6-8 mg/kg/min, preceduta da un bolo alla dose di 200 mg/kg se il paziente è sintomatico, e modificando successivamente la velocità e la concentrazione dell'infusione allo scopo di mantenere i livelli di glicemia nel range di normalità. Il CHI richiede quasi sempre un aumento della velocità di infusione endovenosa di glucosio sino a valori  $\geq 15$  mg/kg/min. Questo elevato fabbisogno di apporto di glucosio in fase diagnostica è un criterio di sospetto di CHI e può richiedere il posizionamento di un catetere venoso centrale per la somministrazione di una soluzione glucosata ipertonica al 15-20%. Inoltre se l'ipoglicemia non risponde al glucosio per via endovenosa, in attesa di definizione diagnostica, possono essere aggiunti farmaci come idrocortisone o glucagone, utilizzato per i suoi potenti effetti di mobilitazione del glucosio epatico. Il glucagone ha un potente effetto iperglicemizzante dovuto all'induzione della mobilitazione epatica di glucosio ed all'aumento della glicolisi e gluconeogenesi. La somministrazione di glucagone, attraverso infusione endovenosa continua alle dosi tra 5 e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ , può inoltre aiutare a ridurre la somministrazione di glucosio necessaria per mantenere l'euglicemia; alcuni Centri suggeriscono di utilizzare da subito questo presidio per raggiungere rapidamente livelli di concentrazione glucidica normali, ottimizzando così i benefici di questa sostanza. Una delle maggiori perplessità nell'utilizzo di questo farmaco risiede nel fatto che questo, in aggiunta alla mobilitazione di glucosio, sia anche un agente insulino-secreto, e la sua somministrazione possa mantenere il meccanismo di ipersecrezione insulinica. Per questo motivo normalmente il glucagone viene usato in associazione con inibitori del rilascio insulinico. Poiché il glucagone agisce anche a livello di altri tessuti, possono essere riscontrati effetti collaterali quali: nausea, vomito, aumento di secrezione dell'ormone della crescita, aumento della contrattilità cardiaca e diminuzione della secrezione acida a livello gastrico ed enzimatica a livello pancreatico. La somministrazione ad alte dosi può portare a tachifilassi e in recenti studi viene segnalato l'associazione di eritema necrolitico migrante con questo tipo di terapia (3,4,5)

Nel trattamento del CHI ci si avvale di terapie il cui target sia l'inibizione del rilascio di insulina o la mobilitazione di glucosio epatico. I farmaci di prima scelta sono quelli che possono essere somministrati per via orale, seguiti in seconda battuta da quelli somministrabili endovena o sottocute (3,6).



Il **Diazossido** è il farmaco di prima scelta nel trattamento del CHI, viene somministrato per via orale, la dose è generalmente calcolata in base al peso corporeo e varia da 5 a 15 mg / kg / die in 2-3 somministrazioni. Il diazossido agisce legandosi alla subunità ABCC8 del canale del  $K^+$  ATP-dipendente e quindi aumentando la probabilità di apertura del canale, con conseguente iperpolarizzazione della membrana e inibizione del rilascio di insulina. Ci sono pareri discordanti riguardo alla frequenza con cui i pazienti rispondono completamente a questo farmaco, la letteratura, infatti, riporta tassi di successo variabili dal 15 al 60 % o più. Queste differenze riflettono la diversa selezione di casi candidati al trattamento, l'efficacia delle diverse dosi in vivo e la nota eterogeneità nella biologia molecolare, nella genetica e nell'istopatologia riscontrata nel CHI. Nella pratica clinica, il tasso di risposta al DZ viene limitato dal livello di tolleranza clinica, che dipende dalla gravità degli effetti collaterali che questo farmaco può comportare. Principali effetti indesiderati sono nausea e vomito, ritenzione di liquidi (edema dei piedi, delle mani e del viso), che nei bambini piccoli può causare insufficienza cardiaca, ipertricosi su braccia, gambe, dorso e viso (che compare nella quasi totalità dei pazienti trattati), iperuricemia, modifiche della fisionomia facciale, ipotensione, e a volte discrasie ematiche, leucopenia e trombocitopenia. Generalmente il Diazossido viene somministrato in combinazione con la Clorotiazide (7-10 mg/kg/ die), un diuretico con l'effetto duplice di diminuire la ritenzione di liquidi e di inibire il rilascio insulinico.

Dimostrato il collegamento fra la perdita dei canali  $K^+$  ATP- dipendenti e l'aumento della secrezione insulinica, questo ha suggerito la possibilità che gli inibitori dei canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio dipendenti possano essere un valido aiuto nel trattamento del CHI. L'efficacia della Nifedipina è stata documentata a partire dal 1996, essa ha il vantaggio, rispetto al DZ di modulare direttamente gli eventi molecolari alla base della secrezione insulinica, può essere assunta oralmente alla dose di 0,25-2,5 mg/Kg al giorno, tuttavia pochi pazienti sono responsivi, il monitoraggio pressorio è mandatorio e l'esperienza clinica appare attualmente limitata.

Gli analoghi della somatostatina, **Octreotide** e **Sandostatina**, sono ausili terapeutici importanti che vengono usati, in alcuni casi anche per svariati anni, in corso di HI-KATP. Questi possono essere somministrati in boli sia sottocute che endovenosi, o più efficacemente in infusione continua sottocutanea (dose: 1-10  $\mu$ g/kg/giorno). La **somatostatina** è un potente inibitore della secrezione insulinica attraverso una modulazione multifattoriale a livello  $\beta$ -cellulare. Questa induce una iperpolarizzazione del potenziale di membrana  $\beta$ -cellulare che previene l'influsso di  $Ca^{2+}$  nella cellula. Per ottenere questo effetto la somatostatina agisce a vari livelli attivando diversi canali del  $K^+$ , fra cui

quelli ATP-dipendenti ed inoltre inibisce i canali del  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti in maniera indipendente dal potenziale di membrana (51). La secrezione insulinica viene inibita anche attraverso meccanismi diversi rispetto alla modulazione del potenziale di membrana e a valle rispetto l'influsso di  $\text{Ca}^{2+}$ , riducendo i livelli citoplasmatici di cAMP ed interagendo direttamente con il meccanismo di esocitosi. La molteplicità dei siti target di questa sostanza è in parte dovuta al fatto che sono stati caratterizzati cinque sottotipi di recettori per la somatostatina SSTR1-5. Poiché i SSTRs sono stati trovati in numerosi tessuti, l'uso degli analoghi della somatostatina è gravato da effetti collaterali tra cui : soppressione della secrezione dell'ormone della crescita, del TSH e dell'ACTH, steatorrea, colelitiasi, distensione addominale e rallentamento della crescita. L'**Octreotide** è un octapeptide, analogo della somatostatina, potente inibitore dell'ormone della crescita, del glucagone e dell'insulina e agisce attraverso una modulazione multifattoriale a livello  $\beta$ -cellulare. Questa induce un aumento del potenziale di membrana  $\beta$ -cellulare che previene l'influsso di Calcio nella cellula e conseguentemente il rilascio di insulina. La secrezione insulinica viene inibita anche attraverso meccanismi diversi rispetto alla modulazione del potenziale di membrana e a valle rispetto all'influsso di calcio, riducendo i livelli plasmatici di cAMP ed interagendo direttamente con il meccanismo di esocitosi. Viene somministrato per via sottocutanea alla dose di 2-10 mcg /Kg/die. Inoltre sia il diazossido, ma in parte anche gli altri farmaci utilizzati nella terapia del CHI, agiscono a livello del canale del potassio ATP-dipendente, e richiedono quindi l'intergrità della funzione del gene ABCC8; tuttavia la correlazione tra difetto genetico e responsività alla terapia farmacologica è ancora da chiarire (37). Recentemente è stato riportato che un trattamento intensivo combinato con basse dosi di octreotide e infusione continua sottocute di glucagone, in pazienti con forma diffusa resistente al diazossido può ritardare se non eliminare la necessità di un intervento chirurgico (52). Mohnike et al. hanno condotto una revisione retrospettiva di 9 bambini con CHI che erano stati trattati con infusione continua sottocutanea di glucagone per settimane o mesi. Il glucagone è stato aggiunto all'octreotide per ovviare la soppressione della secrezione di glucagone endogeno indotta dall'octreotide stesso, liberando in tal modo glucosio mediante la stimolazione della glicogenolisi epatica. In 3 casi, è stato usata una formulazione stabilizzata di glucagone per evitare la cristallizzazione del glucagone che si verifica frequentemente in piccoli volumi. È stato visto che l'introduzione di glucagone aveva consentito la riduzione o l'interruzione della infusione di glucosio tramite cateterismo venoso centrale in tutti i bambini studiati. In 2 pazienti, il glucagone era stato somministrato 'extra' a causa di ipoglicemia ricorrente nonostante la pancreatectomia subtotale. Sei dei 9 bambini sono stati dimessi a casa con questo trattamento, e i loro genitori sono stati in grado di

continuare il trattamento senza registrare ulteriori episodi di ipoglicemia sintomatica, convulsioni o perdita di coscienza. In 3 bambini, è stata continuamente somministrato glucagone per via sottocutanea per 1-4 anni riportando valori glicemici stabili. Tuttavia, per 2 bambini con DiHi si è presentata comunque la necessità dell'intervento di pancreasectomia subtotale. Come effetto collaterale possibile, 2 bambini hanno sviluppato eritema necrolyticum, che si è risolto dopo la sospensione dell'infusione glucagone. Invece l'altezza e il peso non erano stati influenzati dalla dose media di octrotide usata (15 microgrammi/Kg/die). In conclusione, in questa revisione retrospettiva, la terapia combinata basse dosi di octreotide e infusione sottocutanea di glucagone è stata efficace nel prevenire episodi di ipoglicemia grave in pazienti con CHI. Gli autori propongono questo tipo di trattamento come opzione terapeutica al posto di alti tassi di infusione di glucosio attraverso un catetere venoso centrale ed in alternativa alla pancreatocomia subtotale nel tipo diffuso di CHI. (52)

**Tabella 2: schema riassuntivo dei farmaci utilizzati nel trattamento del CHI (6)**

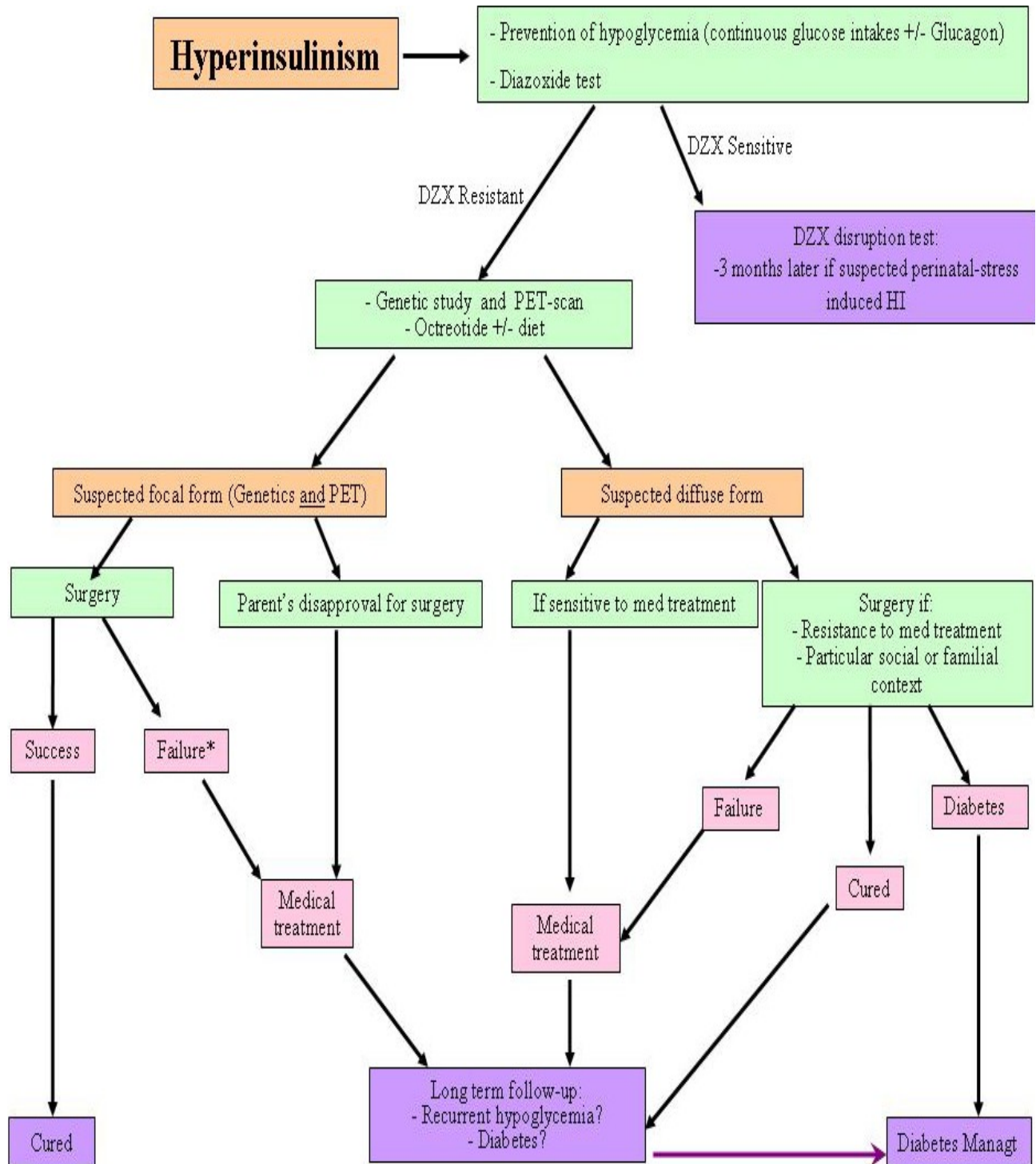
FARMACO	VIA DI SOMMINISTRAZIONE	DOSE	MECCANISMO DI AZIONE	EFFETTI COLLATERALI
DIAZOSSIDO	ORALE	5-20 mg/Kg/die In 3 somministrazioni	Agonista dei canali K ATP dip	Ipertricosi, ritenzione idrica. Raramente eosinofilia, leucopenia, ipotensione
NIFEDIPINA	ORALE	0.25-2.5 mg/Kg/die in 3 somministrazioni	Agonista dei canali Ca <sup>++</sup>	Raramente ipotensione
GLUCAGONE	SOTTOCUTANEA O INFUS EV	1-20 mcg/Kg/h	Aumenta la glicogeno lisi e la gluconeogenesi	Nausea, vomito, secrezione insulinica paradossa a dosi elevate, rash cutaneo.
OCTREOTIDE	SOTTOCUTANEA O INFUS EV CONTINUA OGNI 6-8h	5-25 mcg/Kg/die	Inibisce la secrez insulinica attivando i recettori della somatostatina. Inibisce la mobilizzazione del Calcio e l'attività dell'acetilcolina	Anoressia, nausea, distensione addominale, steatorrea, diarrea, colelitiasi, soppressione GH, TSH, ACTH, glucagone.

### Trattamento chirurgico

Nei pazienti non responsivi al trattamento farmacologico vi è l'indicazione all'intervento chirurgico. Prima dell'intervento chirurgico però deve essere valutata la forma istologica di CHI perché le due forme, focale e diffusa, richiedono tecniche chirurgiche differenti. Nei pazienti con Fo-HI la resezione selettiva delle lesioni focali può essere risolutiva; la diagnosi di forma focale è confermata combinando le indagini genetiche con i risultati della PET. Il sito della lesione infatti consente di pianificare la procedura chirurgica. Tuttavia bisogna ricordare che l'accuratezza della TAC PET nella localizzazione delle lesioni focali è intorno al 70%. La forma focale appare molto più frequente di quanto si riteneva fino a solo qualche anno fa, tanto che dagli ultimi studi emergono percentuali di casi focali fino al 70% dei pazienti operati. In alcuni studi (43) viene anche evidenziato che il 53% delle lesioni focali risiede a livello della testa pancreatica e, nella metà di questi casi, la lesione può localizzarsi nella regione tra il duodeno e il dotto biliare comune, zona che non viene asportata con una pancreasectomia subtotale. Nelle lesioni prossimali nella testa e nel collo del pancreas, si pratica una resezione aperta della lesione con una rima sottile di tessuto pancreatico normale circostante e si esegue una pancreatodigiunostomia distale, che può essere condotta anche per via laparoscopica. La conferma intraoperatoria che la resezione ha margini esenti da malattia è essenziale prima di estubare il paziente. Nei pazienti con forma diffusa si effettua una pancreasectomia subtotale per prevenire una elevata incidenza di iperinsulinemie ricorrenti, e in casi refrattari può essere indispensabile procedere con una pancreasectomia totale, con asportazione del 95-98% dell'organo. Durante l'intervento la coda del pancreas viene sezionata e inviata al patologo per un esame estemporaneo al fine di confermare la diagnosi prima di proseguire l'operazione. Nell'intervento subtotale, la coda il corpo il processo uncinato e parte della testa sono resecati, lasciando una rima di tessuto pancreatico attorno al dotto biliare comune e lungo il margine mediale del duodeno. Nella pancreasectomia totale solo piccole isole di tessuto sono lasciate lungo l'arcata pancreatico digiunale al confine col duodeno. Nel periodo post operatorio si raccomanda di iniziare precocemente la nutrizione enterale e di aumentarla gradatamente, riducendo l'infusione endovenosa di destrosio. Non è inusuale osservare un periodo di gastroparesi, soprattutto dopo la asportazione della testa del pancreas per le lesioni focali o dopo una pancreasectomia subtotale per una forma diffusa, della durata di 2-3 giorni. Il management post operatorio dell'ipoglicemia può richiedere trattamento medico, di solito transitorio. L'ipoglicemia persistente nell'immediato postoperatorio può spiegare una resezione incompleta o eccezionalmente una seconda forma focale nello stesso paziente.

Le complicanze post operatorie più gravi sono di solito conseguenti a una pancreasectomia subtotale, che può comportare ipoglicemia iperinsulinemica ricorrente, lesioni dell'albero biliare, insufficienza del pancreas esocrino ed endocrino. Quest'ultima comporta la necessità di una terapia sostitutiva della funzione esocrina del pancreas con enzimi digestivi, e induce un diabete iatrogeno con necessità di terapia insulinica (48,52 bis).

Di seguito si riporta uno schema esemplificativo del management del HI proposto recentemente da Arnoux et al. (Orphanet Journal of Rare Diseases 2011, 6:63 )



**Figure 11** Management tree for HI patients. DZX: Diazoxide; HI: Hyperinsulinism; Med tratt: Medical treatment. \* Failure of the surgery for a focal form of HI is rare, but happens when the focal form is very

large or when two focal forms coexist within the same pancreas. (Arnoux et al. Orphanet Journal of Rare Diseases 2011, 6:63 )

## Prognosi

La maggior parte dei pazienti trattati farmacologicamente rimangono farmaco - dipendenti per diversi anni, tranne quelli con la forma transitoria neonatale. Tuttavia, alcuni pazienti con buona risposta alla gestione medica (diazossido e / o octreotide) possono avere una completa e relativamente rapida remissione clinica: alcuni mesi in caso di lesione focale e, diversi anni nel caso di forma diffusa. Ciò giustifica l'interruzione del trattamento medico una volta all'anno, sotto controllo medico per cercare un recupero spontaneo. I pazienti con HI focale trattati da pancreatectomia parziale sono completamente guariti. Viceversa, la pancreatectomia subtotale in pazienti con HI diffusa è seguita da ipoglicemia postoperatoria, nonostante l'intervento chirurgico, e / o diabete mellito o grave alterazione della tolleranza al glucosio. L'insufficienza pancreatica esocrina è trattata con la sostituzione degli enzimi pancreatici. L'indagine annuale di secrezione di insulina residua, sulla base dei valori di glicemia e di insulina pre e post-prandiale ad intervalli diversi, nonché la misurazione dell' emoglobina glicata (HbA1c) e un test orale di tolleranza al glucosio (OGTT), è obbligatoria, poiché possono svilupparsi diabete o intolleranza al glucosio. L'esito neurologico può essere preservato mediante un'attenta prevenzione e trattamento intensivo dell' ipoglicemia alla nascita. In pazienti affetti da CHI sono stati riportati casi di ritardo psicomotorio, deficit di apprendimento, convulsioni, epilessia, sordità, strabismo, ed altre sequele neurologiche. Queste complicanze sembrano essere più frequenti e più gravi quando la patologia ha esordio neonatale, quando la diagnosi è posta tardivamente o quando il paziente necessita di trattamento chirurgico, tuttavia senza differenza significative tra forma focale e forma diffusa, confermando che le due varietà istologiche sono clinicamente indistinguibili. Nei pazienti con disabilità di grado moderato non sono state rilevate differenze relativamente all'età di esordio dei sintomi, al trattamento medico o chirurgico o al tipo istologico delle lesioni (53).





## **IL REGISTRO ITALIANO DELL'IPERINSULINISMO CONGENITO DELL'INFANZIA**

Da quanto finora esposto si evince come l'iperinsulinismo congenito dell'infanzia sia una rara malattia di non facile diagnosi e gestione e presenta le problematiche comuni a tutte le malattie rare come: garantire un'adeguata rete assistenziale, utilizzare protocolli/linee guida validati, affrontare problematiche psicosociali. L'iperinsulinismo congenito dell'infanzia non compare nell'elenco delle malattie del Centro Nazionale Malattie Rare dell'Istituto Superiore di Sanità e non gode di un'esenzione specifica per la spesa sanitaria.

Attualmente non sono disponibili dati relativi a incidenza o prevalenza in Italia. A nostra conoscenza, non sono stati pubblicati studi su numeri significativi di pazienti italiani e di conseguenza non ci sono informazioni sulla distribuzione dei casi nel territorio nazionale, frequenza delle varie forme istopatologiche, terapie ed outcome. Inoltre, poco è noto in merito alle basi genetiche del CHI nei pazienti Italiani e presumibilmente molti dei pazienti non sono stati ancora studiati dal punto di vista genetico. Abbiamo quindi pensato che un'indagine su scala nazionale avrebbe permesso di ottenere un'ampia casistica e che un Registro Nazionale sarebbe stato lo strumento migliore per raccogliere, registrare, ed elaborare dati sui pazienti affetti da CHI. Per tale motivo, nell'ambito di un programma di ricerca cofinanziato dal MIUR e a cui hanno partecipato il Centro di Endocrinologia dell'Infanzia e dell'Adolescenza, Università Vita-Salute San Raffaele di Milano, il Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche dell'Università degli Studi di Milano, il Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche dell'Università degli Studi dell'INSUBRIA e il Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Catania, è stato istituito il Registro Italiano dell'Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia (RICI). Lo scopo del RICI è quello di valutare l'incidenza della patologia in Italia, i protocolli di accesso alla diagnosi, le procedure diagnostiche, le basi genetiche della patologia, le procedure di follow-up. Inoltre il Registro è un mezzo per aumentare le conoscenze sulla storia naturale della patologia in quanto consente lo sviluppo di studi combinati tra epidemiologia e aspetti clinici, volti ad evidenziare i determinanti etiologici ed i fattori di rischio ad essi associati. Un'aggregazione nazionale di esperienze, con il necessario confronto internazionale, potrebbe consentire di esprimere una massa critica di ricerca utile per lo sviluppo di approcci diagnostici, terapie e modalità assistenziali.

Allo scopo di perseguire i due obiettivi primari del progetto (raccolgere un'ampia casistica di pazienti italiani affetti da Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia e istituire un Registro nazionale dell'Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia) è stato effettuato quanto segue:

1) creazione di una scheda cartacea per la raccolta dei dati del singolo paziente da inserire nel registro. La scheda consta di n. 3 pagine e comprende i seguenti campi: dati del Centro di provenienza del paziente e del medico compilatore; dati anagrafici del paziente; dati rilevanti alla nascita; l'anamnesi familiare; dati auxologici e clinici e l'anamnesi nutrizionale al momento della diagnosi; dati di laboratorio ed eventuali indagini strumentali al momento della diagnosi; la terapia eseguita ( date di inizio e sospensione, dosi iniziali e attuali, eventuali effetti collaterali del farmaco o dei farmaci utilizzati); eventuale intervento chirurgico; studio genetico ( in tale campo viene richiesto se il paziente ha eseguito già lo studio genetico o in caso negativo se desidera eseguirlo nell'ambito del progetto (vedi compiti dell'Unità coordinatrice); quadro neurologico ( con quesiti relativi alla presenza di eventuali sequele neurologiche della patologia); nella terza pagina della scheda, eventualmente ripetibile, è prevista la raccolta dei dati auxologici ( altezza, peso, velocità di crescita, circonferenza cranica, età ossea) nel corso del follow-up (visite annuali).

2) Istituzione del Registro. Il nostro progetto è stato sottoposto al Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico "G.Rodolico" di Catania. Sono stati realizzati: una Nota Informativa per il paziente o per i familiari, in cui si espongono i fini e le modalità del progetto, e un Consenso Informato che il paziente o i familiari devono firmare per autorizzare la raccolta e la registrazione dei dati del paziente nel Registro stesso. Il suddetto Comitato Etico ha dato parere positivo autorizzando lo studio in data 23 Novembre 2007.

3) Realizzazione del sito WEB del Registro. Tale sito è on-line all'indirizzo: [www.progettorigici.it](http://www.progettorigici.it). E' stato realizzato anche un logo per il registro che comprende l'immagine stilizzata di un pancreas e la scritta Progetto RICi. Nella home-page appare il logo e la denominazione del registro (RICi: Registro italiano dell'Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia). Sempre nella home-page si fa riferimento al progetto del MIUR, ai Centri coinvolti e all'istituzione del Registro con la relativa sede presso il Dipartimento di Pediatria dell'AOU Policlinico "G.Rodolico" Catania. Dalla home-page si accede alle seguenti sezioni: "L'iperinsulinismo"; "Il Progetto"; "Novità"; "Link utili"; "Area files"; "Registrazione"; "Mailing List"; "Contatti". Nella pagina denominata "L'iperinsulinismo" si forniscono informazioni medico-scientifiche sulla malattia. Nella pagina denominata "Il Progetto" si espongono i fini e le modalità operative del Registro e anche di altri aspetti del progetto (studio genetico presso

l'Unità Coordinatrice); nella pagina dei "Contatti" sono fornite tutte le indicazioni per contattare tramite telefono/FAX/ posta elettronica il Registro, i Centri e gli operatori coinvolti nel progetto. Dalla pagina "Registrazione" è possibile per i medici che vogliono collaborare con il Registro registrarsi e poter così accedere alla pagina "Area files" e scaricare i relativi documenti (Nota informativa per il paziente o i familiari; Consenso Informato; Scheda raccolta dati). E' possibile inoltre registrarsi in una "mailing list" per ricevere informazioni sull'attività e i risultati del Registro. Attraverso la sezione "Novità" verranno date informazioni relative a pubblicazioni, incontri, convegni sull'Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia. Infine dalla sezione "Link utili" è possibile collegarsi ai siti di diverse società scientifiche e organizzazioni a diverso titolo collegate con la patologia e/o l'attività del Registro.

4) Informazione a mezzo carta stampata ai colleghi responsabili delle Unità Operative di neonatologia e pediatria del territorio italiano dell'istituzione del registro e invito a visitare il sito WEB ed eventualmente a registrarsi per inviare i dati dei loro pazienti al Registro.

5) Ulteriore diffusione dell'informazione mediante la Società Italiana di Pediatria e la Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica che tramite i rispettivi siti web hanno comunicato ai propri soci l'istituzione del Registro e del relativo sito web.

6) Creazione di un archivio informatico dove vengono trasferiti i dati dei pazienti con iperinsulinismo congenito dell'infanzia trasmessi al registro tramite la scheda cartacea (fig.13).

Il software consta di una scheda elettronica che riproduce i campi della scheda cartacea predisposta per la trasformazione dei dati in modo da poter essere elaborati e sottoposti alle appropriate valutazioni statistiche .

Fig. 12: Home page del sito del progetto RICi



**Il Registro**

**L'Iperinsulinismo**

**Il progetto**

**Novità**

**Link utili**

**Area files**

**Registrazione**

**Mailing list**

**Contatti**

**Registro Italiano dell'Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia**

**I Workshop italiano sull'Iperinsulinismo congenito dell'infanzia**

**Locandina**      **Programma**

Il Registro italiano dell' Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia (RICI) è stato istituito nell'ambito di un progetto finanziato dai Programmi di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale del Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca Scientifica (DM 28 Dicembre 2006).

Le Unità di Ricerca coinvolte nel Progetto sono:

-  **Università Vita-Salute San Raffaele Milano**  
Centro Coordinatore  
Responsabile Scientifico Prof. Giuseppe Chiumello
-  **Università degli Studi di Catania**  
Responsabile Scientifico Prof.ssa Manuela Caruso
-  **Università degli Studi INSUBRIA Varese-Como**  
Responsabile Scientifico Prof. Alessandro Salvatori

La sede del Registro si trova presso:

-  **Dipartimento di Pediatria**  
**Azienda Ospedaliero-Universitaria**  
**"Policlinico-Vittorio Emanuele"**  
**Presidio "G. Rodolico"**  
**Catania**

In questo sito troverai notizie sull'Iperinsulinismo Congenito dell'Infanzia, sul nostro progetto di ricerca e sull'organizzazione, il funzionamento e gli scopi del Registro. Le informazioni fornite nel sito non possono sostituire il rapporto tra il paziente ed il medico curante.

**Fig.13 Scheda raccolta dati del Registro**

**Caso sospetto**

**REGISTRO ITALIANO IPERINSULINISMO CONGENITO DELL'INFANZIA**

**Caso accertato**

<b>DATI CENTRO</b>		
DENOMINAZIONE ENTE:.....		
INDIRIZZO:.....		
RESPONSABILE:.....		
SCHEDA COMPILATA DA: .....	IL: .....	QUALIFICA: .....
TEL.....	FAX.....	E-mail.....

**SCHEDA PAZIENTE**

<b>DATI ANAGRAFICI</b>		
COGNOME.....	NOME:.....	SESSO: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> DATA DI NASCITA.....
LUOGO DI NASCITA : .....		

**DATI ALLA NASCITA**

ETA' GESTAZIONALE  PESO:.....LUNGHEZZA:.....CIRCONFERENZA CRANICA.....APGAR .....

PESO INIZIO GRAVIDANZA ..... PESO FINE GRAVIDANZA..... MODALITA' PARTO: Spontaneo  Taglio Cesareo

ASFISSIA: SI  NO

**ANAMNESI FAMILIARE**

CONSANGUINEITA' NO  SI

DIABETE MELLITO INSULINO DIPENDENTE: NO  SI (\*)

DIABETE MELLITO NON INSULINO DIPENDENTE: NO  SI (\*)

ALTRI CASI DI IPOGLICEMIA O IPERINSULINISMO CONGENITO: NO  SI (\*)

ALTEZZA MADRE (cm).....ALTEZZA PADRE (cm).....

\* SE "SI" SPECIFICARE GRADO DI PARENTELA CON IL PAZIENTE

**DATI ALLA DIAGNOSI**

ETA' (mesi):.....LUNGHEZZA (cm):.....PESO (Kg):.....

MALFORMAZIONI : .....

SINTOMATOLOGIA ESORDIO: CONVULSIONI : NO  SI

COMA : NO  SI

NESSUNA : NO  SI

ALTRO .....

**Anamnesi nutrizionale al momento della diagnosi**

Allattamento: seno materno  artificiale  misto

Svezzamento NO  SI  Età in mesi..... Numero pasti.....

**DATI LABORATORIO AL MOMENTO DELLA DIAGNOSI**

<p><i>(N.B. GLICEMIA E INSULINEMIA ESEGUITI CONTEMPORANEAMENTE)</i></p> <p>1. GLICEMIA:.....INSULINEMIA:.....DATA.....</p> <p>2. GLICEMIA:.....INSULINEMIA:..... DATA.....</p> <p>3. GLICEMIA:.....INSULINEMIA:.....DATA.....</p> <p>ALTRI ESAMI ESEGUITI IN CORSO DI IPOGLICEMIA:</p> <p>GH:..... DATA.....</p> <p>CORTISOLEMIA:..... DATA.....</p>	<p>CHETONEMIA:..... DATA.....</p> <p>CHETONURIA:..... DATA.....</p> <p>ACIDO LATTICO:..... DATA.....</p> <p>ACIDI ORGANICI URINARI:..... DATA.....</p> <p>TRIGLICERIDI:..... DATA.....</p> <p>AMMONIEMIA:..... DATA.....</p> <p>ALTRO.....VALORE..... DATA.....</p> <p>.....</p>
--	--

<b>EVENTUALI INDAGINI STRUMENTALI</b>			
ECOGRAFIA	NO	SI	data.....referto (riassunto).....
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
TC/RMN	NO	SI	data.....referto (riassunto).....
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
CATETERISMO	NO	SI	data.....referto (riassunto).....
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALTRO.....			

**TERAPIA**

<p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Diazossido</p> <p><b>1° FARMACO PRESCRITTO</b></p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Octreotide</p> <p>DATA INIZIO.....</p> <p>DOSE INIZIALE (mg/die):.....</p> <p>DOSE ATTUALE (mg/die):.....</p> <p>DATA EVENTUALE SOSPENSIONE:.....</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Ipoglicemia</p> <p><b>CAUSA SOSPENSIONE</b></p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Effetti collaterali</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Alterazioni esami di Laboratorio</p>	<p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Diazossido</p> <p><b>2° FARMACO PRESCRITTO</b></p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Octreotide</p> <p>DATA INIZIO.....</p> <p>DOSE INIZIALE (mg/die):.....</p> <p>DOSE ATTUALE (mg/die):.....</p> <p>DATA EVENTUALE SOSPENSIONE:.....</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Ipoglicemia</p> <p><b>CAUSA SOSPENSIONE</b></p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Effetti collaterali</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;"><input type="checkbox"/> Alterazioni esami di Laboratorio</p>
---	---

**ASSOCIAZIONE DI ALTRI FARMACI DATA INIZIO E SOSPENSIONE:**.....

.....

.....

.....

.....

.....



**EVENTUALE INTERVENTO CHIRURGICO:**

NO  PARZIALE  SUBTOTALE  TOTALE

Data : .....

ISTOLOGICO: .....

**STUDIO GENETICO**

E' STATO ESEGUITO PER L'IPERINSULINISMO ? NO  SI  SE "SI" DOVE:.....

RISULTATI STUDIO GENETICO:.....

SE NON E' STATO ESEGUITO, IL PAZIENTE E I FAMILIARI SONO DISPONIBILI A SOTTOPORSI ALLO STUDIO GENETICO? NO  SI

SE "SI" RICEVERETE MODALITA' DI PRELIEVO E SPEDIZIONE DEL CAMPIONE E RELATIVO MODULO DI CONSENSO INFORMATO

ALTRE INDAGINI GENETICHE NO  SI  (Amniocentesi, cariotipo, ...) .....

**QUADRO NEUROLOGICO** ~~Compilare via Fax al seguente numero:~~

TAPPE SVILUPPO PSICOMOTORIO: HA PARLATO A: (mesi) ..... HA CAMMINATO A: (mesi) ..... E' PRESENTE EPILESSIA? NO  SI

SONO PRESENTI DISABILITA'? NO  SI  SE "SI" QUALI:.....

EEG: NO  ESEGUITO  ESITO: .....

RM ENCEFALO: NO  ESEGUITO  ESITO: .....

VALUTAZIONE SVILUPPO PSICOINTELLETTIVO: NO  ESEGUITO  ESITO: .....

095. \_\_\_\_\_

FIRMA DEL MEDICO

\_\_\_\_\_

**FOLLOW-UP CLINICO-AUXOLOGICO \*(intervallo almeno annuale)**

DATA VISITA:.....

ETA' CRONOLOGICA..... PESO (Kg) :..... ALTEZZA (cm) :..... VELOCITA' DI CRESCITA(cm/a):..... CIRCONFERENZA CRANICA (cm) :.....

VALUTAZIONE CLINICA:.....  
Dai compilare ed inviare via Fax al seguente numero:.....

DATI LABORATORIO:.....

DATI STRUMENTALI:..... ETA' OSSEA:.....

DATA VISITA:.....

ETA' CRONOLOGICA..... PESO (Kg) :..... ALTEZZA (cm) :..... VELOCITA' DI CRESCITA(cm/a):..... CIRCONFERENZA CRANICA (cm) :.....

VALUTAZIONE CLINICA:.....

DATI LABORATORIO:.....

DATI STRUMENTALI:..... ETA' OSSEA:.....

DATA VISITA:.....

ETA' CRONOLOGICA..... PESO (Kg) :..... ALTEZZA (cm) :..... VELOCITA' DI CRESCITA(cm/a):..... CIRCONFERENZA CRANICA (cm) :.....

VALUTAZIONE CLINICA:.....

DATI LABORATORIO:.....

DATI STRUMENTALI:..... ETA' OSSEA:.....

DATA VISITA:.....

ETA' CRONOLOGICA..... PESO (Kg) :..... ALTEZZA (cm) :..... VELOCITA' DI CRESCITA(cm/a):..... CIRCONFERENZA CRANICA (cm) :.....

VALUTAZIONE CLINICA:.....

DATI LABORATORIO:.....

DATI STRUMENTALI:..... ETA' OSSEA:.....

DATA VISITA:.....

ETA' CRONOLOGICA..... PESO (Kg) :..... ALTEZZA (cm) :..... VELOCITA' DI CRESCITA(cm/a):..... CIRCONFERENZA CRANICA (cm) :.....

VALUTAZIONE CLINICA:.....

DATI LABORATORIO:.....

DATI STRUMENTALI:..... ETA' OSSEA:.....

DATA VISITA:.....

ETA' CRONOLOGICA..... PESO (Kg) :..... ALTEZZA (cm) :..... VELOCITA' DI CRESCITA(cm/a):..... CIRCONFERENZA CRANICA (cm) :.....

VALUTAZIONE CLINICA:.....

DATI LABORATORIO:.....

DATI STRUMENTALI:..... ETA' OSSEA:.....

---

**FIRMA DEL MEDICO**

---

Come già detto, lo scopo del presente studio è stato quello di analizzare e descrivere le caratteristiche di una coorte di pazienti italiani con CHI e confrontarlo con i dati presenti in letteratura.

## **PAZIENTI E METODI**

Questo studio si è basato sui dati presenti nel Registro Italiano di CHI, che è stato istituito nel 2008 (PRIN 20060633299, proseguendo la sua attività ad oggi con il supporto del PRIN 2008WY2TY9). I dati acquisiti grazie alla collaborazione di tutti i colleghi che seguono pazienti affetti da CHI vengono poi trasferiti in una specifica MS-Access base per la registrazione ed elaborazione degli stessi. Allo stato attuale, disponiamo dei dati di 54 pazienti affetti da CHI provenienti da 7 centri di riferimento ma da più regioni di Italia (Lombardia, Sicilia, Campania, Puglia, Emilia Romagna, Calabria, Marche, Sardegna, provincia di Trento e Bolzano). Sono stati analizzati i dati relativi : alla nascita, alla consanguineità, alla storia familiare, all'età e ai sintomi alla diagnosi, ai criteri diagnostici, alla gestione e al trattamento, ai parametri auxologici, alla genetica, e all'outcome.

## **ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test del t di Student, il test di Mann-Whitney

## **RISULTATI**

La nostra coorte comprende 54 pazienti, diagnosticati tra il 1974 e il 2010: 50 caucasici di origine italiana, 3 arabi di origine nord africana e 1 ispanica di origine sudamericana; 33 pazienti sono maschi e 21 femmine (rapporto maschi-femmine = 1.4:1). L'età media attuale della popolazione è  $11,8 \pm 6$  anni e il follow-up medio ha una lunghezza di 5,8 anni.

**Anamnesi familiare:** La consanguineità era presente nel 13% dei pazienti e nel 55% dei casi erano segnalate alterazioni del metabolismo del glucosio (ipoglicemia e iperglicemia in 4 e 2 membri della famiglia, rispettivamente, diabete gestazionale in 2 madri, diabete mellito in 23 soggetti tra genitori e nonni (15 non insulino-dipendente, e 7 insulino-dipendente)).

**Dati alla nascita.** Alla nascita, l'età gestazionale mediana è stata di 39 settimane, la mediana del peso era di 3520 gr (0,34 SDS), la lunghezza media 50 cm (0,49 SDS), e la mediana della circonferenza del cranio 32,5 cm (- 0,32 SDS). Vi era una differenza significativa (Mann-Whitney,  $p = 0,05$ ) tra il peso alla nascita di pazienti con diagnosi entro 1 mese di vita (3750 g) e pazienti con diagnosi dopo 1 mese di vita (3310 g). Non segnalate né forme sindromiche né malformazioni

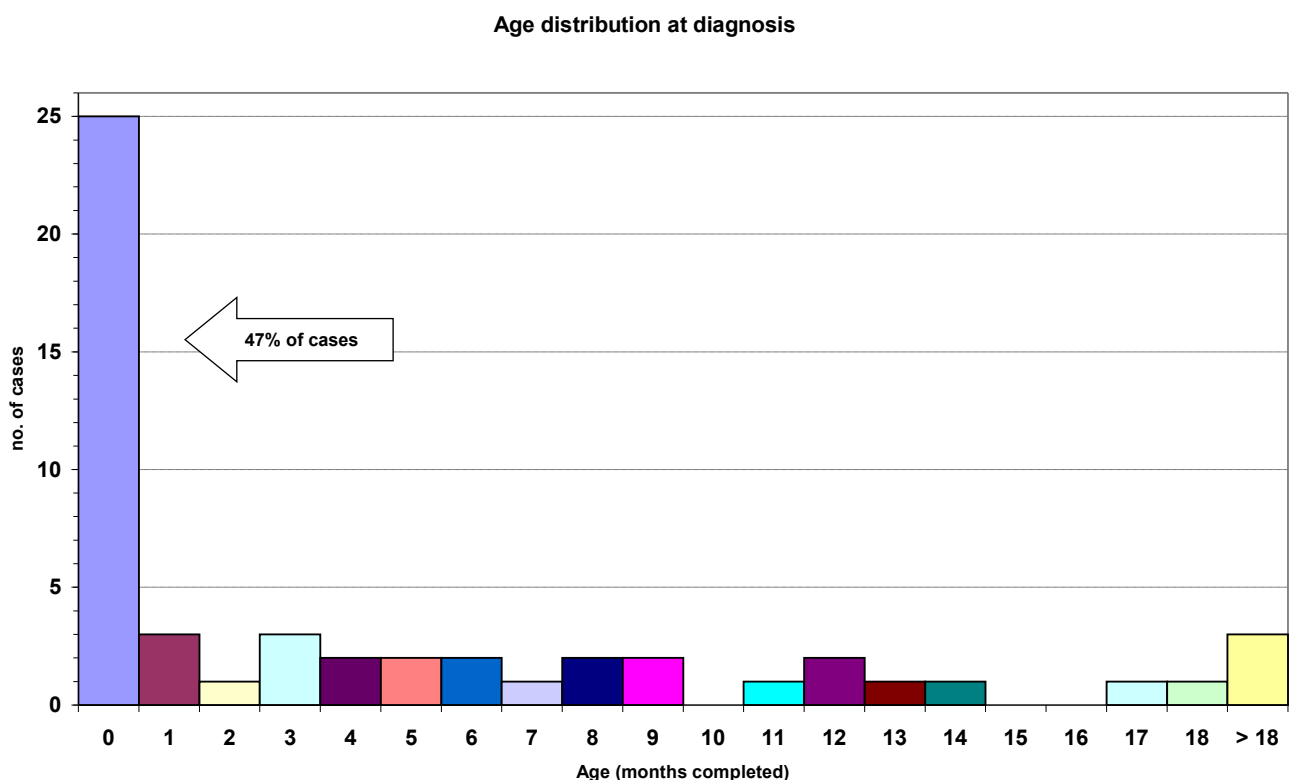
maggiori, fatta eccezione per la presenza di 2 pazienti con difetti cardiaci minori, e 1 caso di criptorchidismo.

**Tabella : Dati alla nascita**

	<b>Mediana</b>	<b>25°-75° percentile</b>	<b>Mediana SDS</b>	<b>25°-75° percentile</b>
<b>Età gestazionale (settimane)</b>	39	37.5-40	-	-0.49-1.32
<b>Peso (gr)</b>	3520	3200-4000	0.30	-0.90-1.32
<b>Lunghezza (cm)</b>	50	48-52	0.49	-0.90-1.32
<b>Circonferenza cranica (cm)</b>	34	33.8-36	-0.2	-1.68-1.01

## Diagnosi

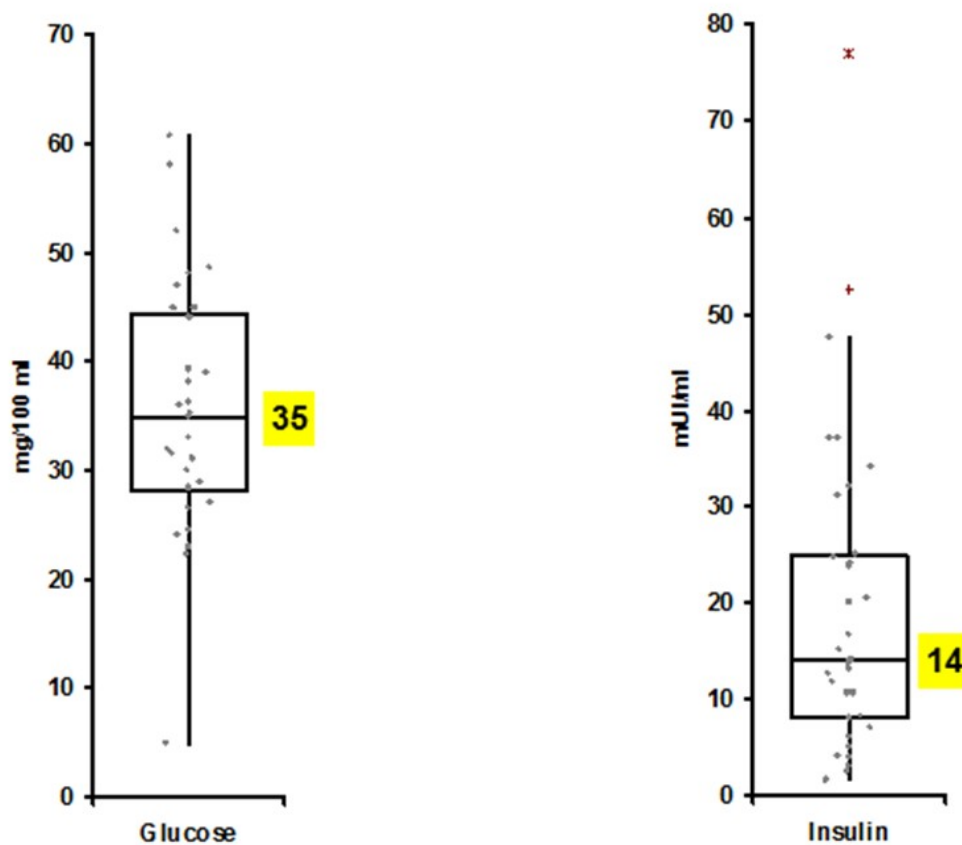
Quasi la metà dei casi (47%) sono stati diagnosticati entro il primo mese di vita. La distribuzione per età alla diagnosi è mostrato in figura:



Basandoci sull'età e i sintomi d'esordio possiamo distinguere una forma ad esordio severo nel 61% dei casi e una forma ad esordio lieve nel 39% dei casi. I sintomi all'esordio erano rappresentati da convulsioni in 33 pazienti (in 14 pazienti le crisi epilettiche sono state precedute da letargia, ipotonia, cianosi, apnea, e suzione ipovalida); in 1 paziente la crisi convulsiva ha preceduto lo stato comatoso; in 8 pazienti sono stati segnalati tremori, ipotonia, e cianosi post critica. Dieci pazienti erano asintomatici e sono stati diagnosticati attraverso la valutazione del glucosio eseguita di routine. La diagnosi di CHI è stata fatta in base ai criteri standard riconosciuti a livello internazionale: l'ipoglicemia a digiuno e post-prandiale (<2,5-3 mmol / l), valori di insulina non soppressi, e assenza di corpi chetonici nel plasma e nelle urine (3). Al momento della

diagnosi, i livelli medi di glucosio nel sangue erano 35 mg / dl e l' insulinemia plasmatica media era 13,5 mU / ml, mentre corpi chetonici nel sangue e / o nelle urine erano assenti in tutti i casi. In 6 casi è stato eseguito un test al glucagone. I livelli di acidi grassi plasmatici erano normali e gli acidi organici urinari sono risultati negativi in tutti i casi. L'iperammoniemia è stata osservata in due casi.

**Figura 13. . Livelli medi di glicemia e insulinemia alla diagnosi**





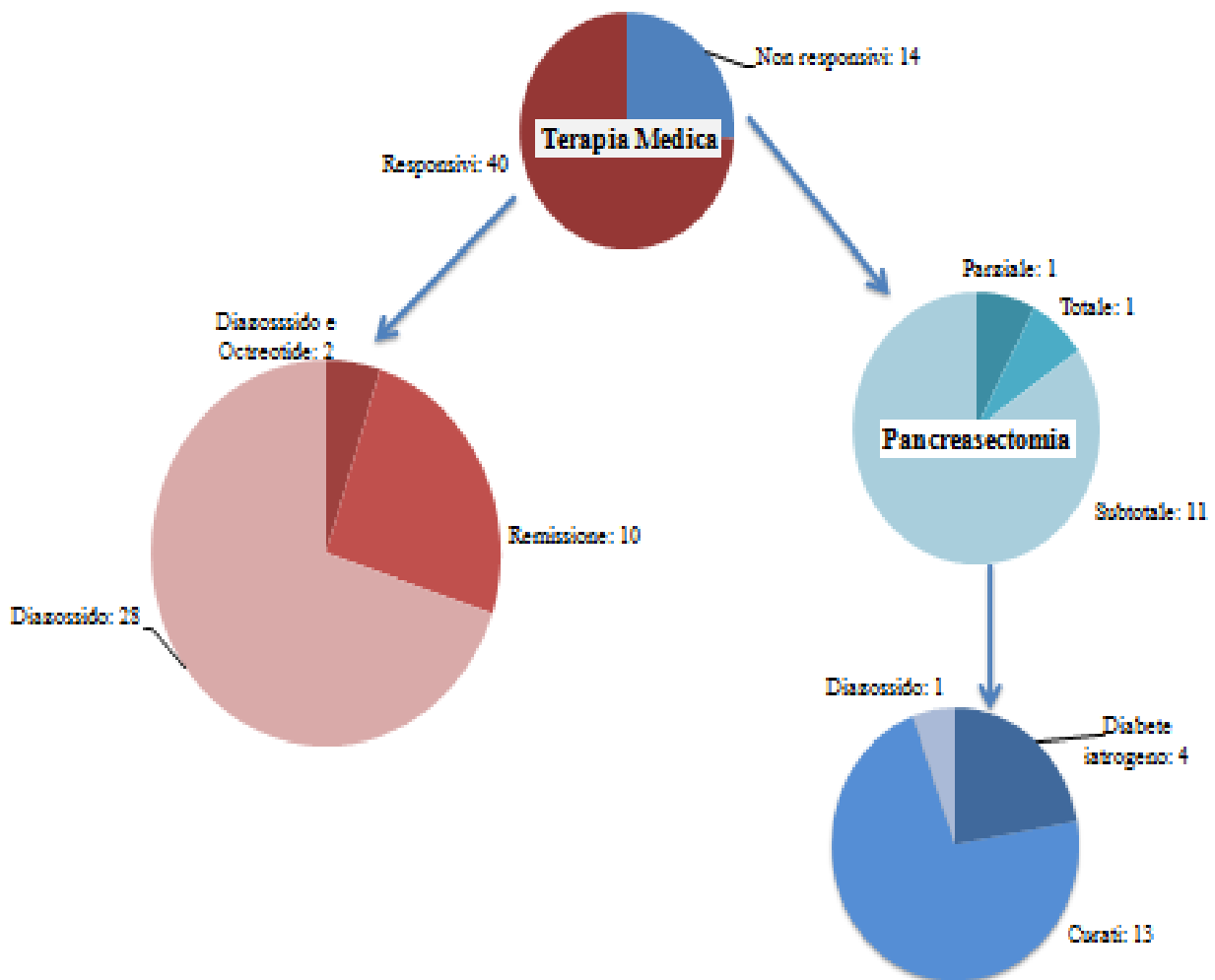
## Trattamento

Il Diazossido è stato il trattamento iniziale in tutti i pazienti, con una dose media giornaliera di  $10,6 \pm 3,4$  mg / kg (range 5-18 mg / kg / giorno) in due somministrazioni/die. L'Octreotide è stato aggiunto al diazossido in 11 pazienti, a dosaggi compresi 5-35  $\mu$  g / kg / die in due o tre somministrazioni/die. Tutti i pazienti hanno seguito un regime alimentare con poppate frequenti. La risposta metabolica è stata valutata mediante il monitoraggio dei livelli di glucosio prima di ogni pasto, ogni 2-3 ore dopo la poppata e successivamente ad intervalli più lunghi. Al bisogno è stato indicato l'uso di farina di mais (integrata nei pasti di latte) alla dose di 1-2 g / kg, e una dieta arricchita di carboidrati.

## Outcome

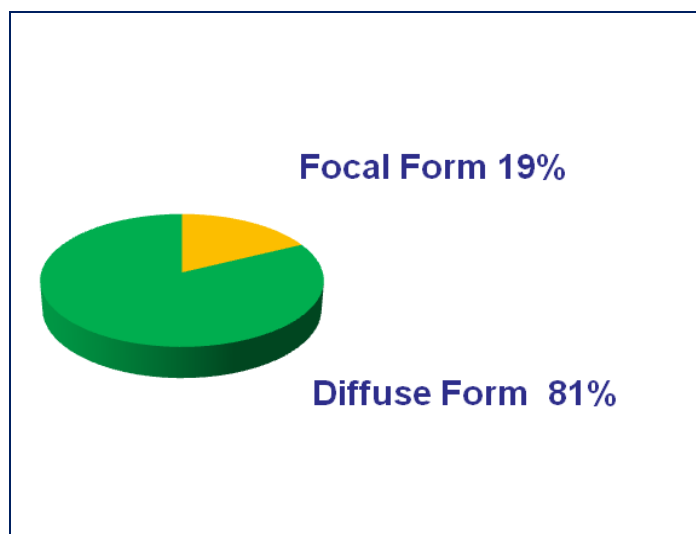
I pazienti sono stati definiti *unresponsive* al trattamento medico in caso di ipoglicemia ( $<3$  mmol / l) nonostante un dosaggio massimo di diazossido e / o octreotide e una adeguata alimentazione. Quaranta pazienti (74%) sono stati sensibili alle cure mediche; dopo la dimissione è stato richiesto a domicilio il monitoraggio della glicemia capillare prima di ogni pasto; i valori sono stati controllati dal medico responsabile del paziente su base settimanale nei neonati e poi mensilmente. In pazienti che presentavano livelli di glucosio a digiuno superiori al normale, è stata prescritta una lenta e progressiva riduzione della dose di diazossido. Ad oggi, 10 pazienti che hanno risposto al diazossido sono in remissione e il trattamento è stato interrotto dopo  $5,3 \pm 4,6$  anni; 28 pazienti continuano a seguire il trattamento con diazossido, e 2 pazienti seguono il trattamento con diazossido e octreotide. Non sono state osservate gravi effetti avversi dei farmaci, tranne in un paziente in cui il diazossido è stato temporaneamente interrotto a causa dello sviluppo di insufficienza cardiaca congestizia. Quattordici pazienti non erano sensibili alle cure mediche e hanno richiesto l'intervento chirurgico: la pancreatectomia subtotale è stata eseguita in 11 pazienti, la pancreatectomia totale in 1 paziente, e la pancreatectomia parziale in 2 pazienti. Tredici pazienti sono guariti. In 1 paziente si è verificata un' ipoglicemia dopo pancreatectomia subtotale, per cui il trattamento con diazossido è stato riavviato ottenendo un buon compenso glicometabolico evitando un ulteriore intervento chirurgico. In 4 di questi 14 pazienti (28,5%), dopo l'intervento chirurgico, è insorto il diabete mellito insulino-dipendente (Fig.14 ).

Fig.14 . Outcome del trattamento medico e chirurgico



### **Forme Focali / Diffuse.**

Nessuno dei 14 pazienti sottoposti a pancreasectomia è stato valutato prima dell'intervento con [18F]-6-fluorodopa PET, perché questa indagine non era disponibile al momento della diagnosi; il cateterismo venoso pancreatico e la valutazione istologica sono stati eseguiti ed hanno evidenziato una forma di DiHI in 9 casi e di FoHI in 2 casi; in 3 pazienti però questo tipo di informazione non è stata disponibile. La scansione PET con [18F]-6-fluorodopa è stata eseguita in 13 pazienti. In 3 pazienti trattati con pancreasectomia subtotale, la scansione PET ha confermato una forma diffusa di CHI, in 10 pazienti responsivi alla terapia medica, la PET ha rivelato 2 forme focali e 8 forme diffuse. In un totale di 21 pazienti, combinando le informazioni disponibili (sia da cateterismo che da istologia che da scansione PET con [18F]-6-fluorodopa), abbiamo trovato quattro forme focali (19%) e 17 forme diffuse (81%).



### **Out come neurologico.**

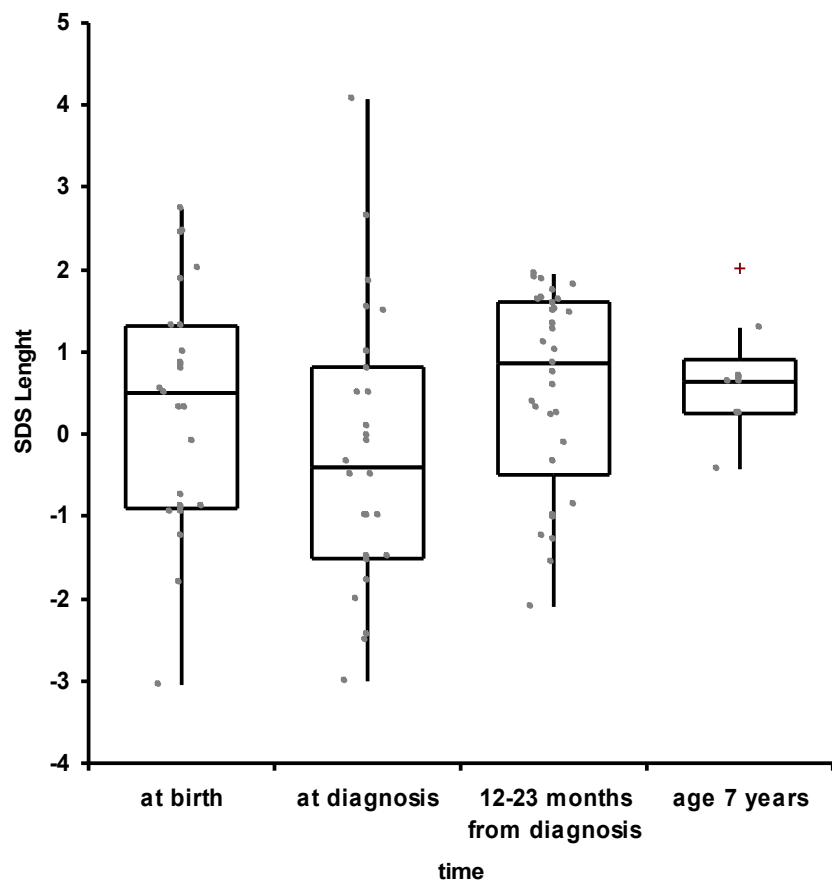
L'outcome dello sviluppo neurologico è stato valutato retrospettivamente dai medici dei rispettivi pazienti affetti da CHI sulla base dei dati presenti nelle loro cartelle cliniche. L'EEG era stato eseguito in tutti i pazienti e la risonanza magnetica dell'encefalo in 29 pazienti. Anomalie del tracciato EEGrafico sono state trovate in 10 pazienti e anomalie nella RMN in 12 pazienti. La maggior parte dei pazienti erano stati sottoposti di routine all'esame neurologico. Sequele neurologiche erano presenti in 15 pazienti (28%). Di frequente riscontro i problemi di linguaggio così anche deficit neurosensoriali e motori. La tabella 4 riporta la frequenza delle sequele neurologiche.

Tabella 4 . **Outcome neurologico nel RIC**

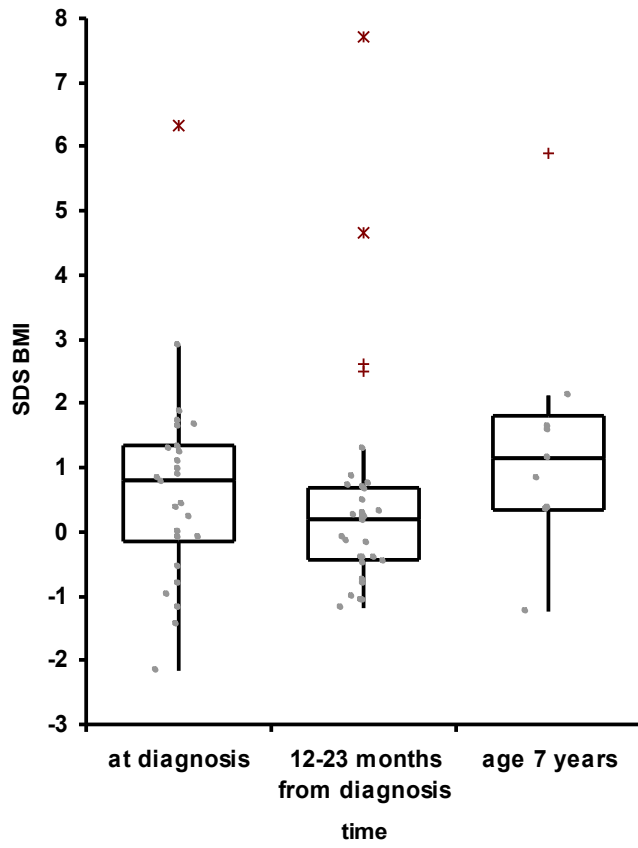
<b>Outcome neurologico</b>	<b>Pazienti n. (%)</b>
Epilessia	4/54 (7.4 %)
Ritardo psicomotorio grave	1/54 (1.8 %)
Ritardo psicomotorio lieve	1/54 (1.8 %)
Altri disordini psicomotori	4/54 (7.4 %)
Ipoacusia	2/54 (3.7 %)
Problemi di linguaggio	6/54 (11 %)
Ipotonia	1/54 (1.8 %)
Anormalità EEG	10/37 (27 %)
Anormalità RMN	12/31 (38.7 %)

## Dati auxologici.

Dati auxologici alla nascita, alla diagnosi e al follow-up (età media 7 anni) sono mostrati in figura:



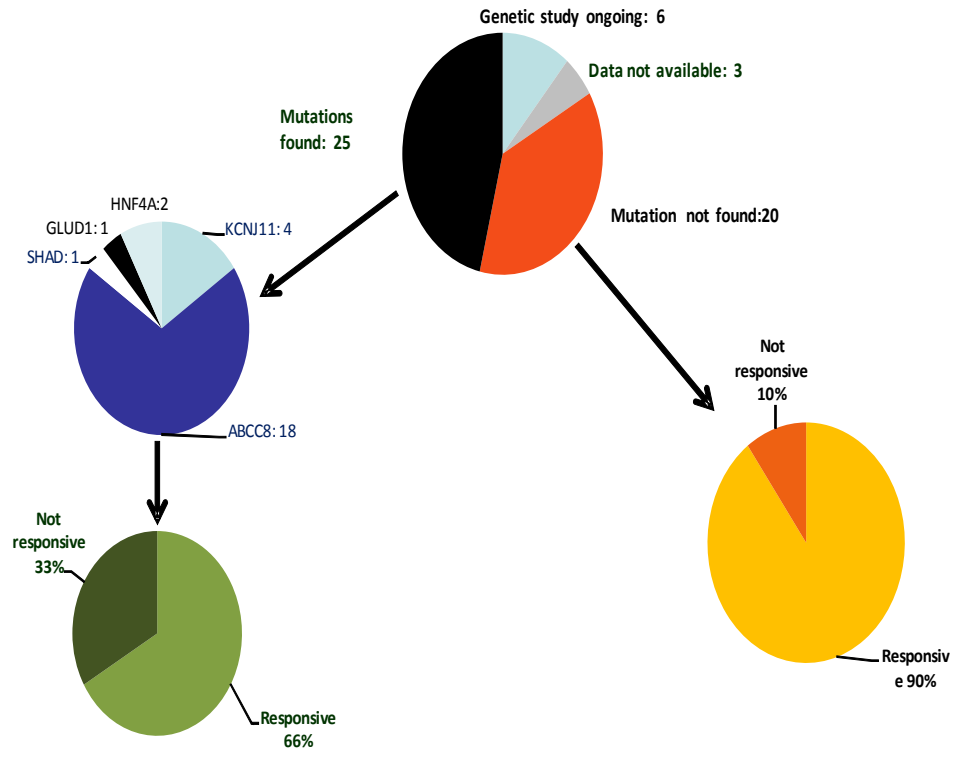
I dati mostrano la normale crescita staturale dopo la diagnosi, con una tendenza al sovrappeso.



## **Dati genetici**

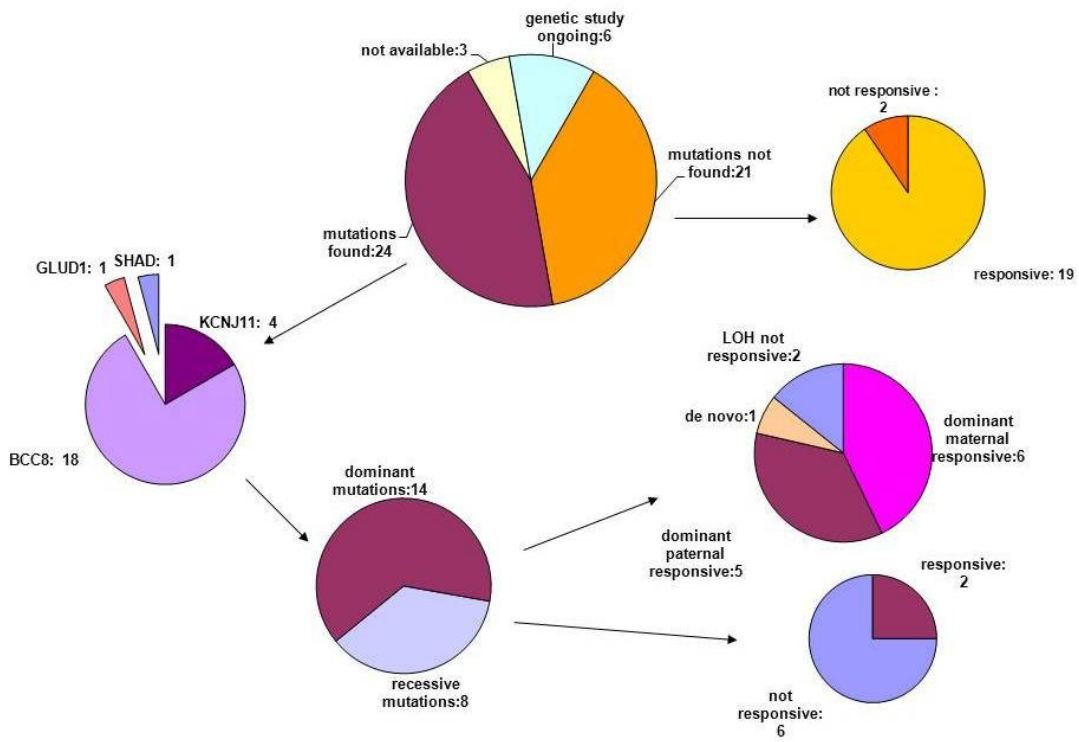
Lo studio genetico è stato condotto nella quasi totalità dei pazienti, ma ad oggi 6 di questi risultano in corso, e in 3 casi i dati non sono disponibili o risultano ancora incompleti. Le mutazioni più frequentemente riscontrate sono a carico dei geni ABCC8 e KCNJ11. Il gene ABCC8 è risultato mutato in 18 pazienti e il gene KCNJ11 in 4 pazienti. Di queste mutazioni 14 sono a trasmissione autosomica dominante: 5 di origine paterna, 6 di origine materna, 2 dovute a loss of eterozygosity (LOH) e 1 mutazione de novo. Le restanti 8 mutazioni individuate su ABCC8 e KCNJ11 sono a trasmissione autosomica recessiva. In 20 pazienti non sono state individuate mutazioni a carico di tali geni. Seppur la casistica non sia ancora così ampia sono state ritrovate delle mutazioni molto rare che causano CHI, una sul gene HADH, una sul gene GLUD1 e due sul gene HNF4A, una delle quali è stata riscontrata in un paziente con già una mutazione su ABCC8 a trasmissione AD di origine paterna. Confrontando i dati di genetica con la responsività al trattamento farmacologico possiamo affermare che i pazienti responsivi alla terapia con diazossido e/o octreotide rappresentano il 90% dei pazienti non mutati e il 66% dei pazienti mutati.

Tab 5: dati genetici e responsività al trattamento





**Tab. 6: dati genetici e responsività al trattamento**



## DISCUSSIONE

In questo studio presentiamo i dati di una coorte significativamente ampia di pazienti con CHI. I dati sono stati ottenuti dal Registro Italiano per CHI (RICI) e rappresentano la prima valutazione dei pazienti italiani con CHI. CHI è un'entità eterogenea sia per la genetica, che per la presentazione clinica, la gravità, la forma istologica, la risposta al trattamento e ai risultati. Fino ad ora abbiamo avuto poche informazioni sulle caratteristiche dei pazienti italiani. Rispetto alle serie pubblicate, questa coorte di pazienti presenta alcune somiglianze e alcune differenze. Come riportato in letteratura [12, 13, 16] le mutazioni più frequentemente riscontrate come causa di CHI nei nostri pazienti sono quelle a carico dei geni ABCC8 e KCNJ11 (circa il 40%), con una netta prevalenza di quelle di ABCC8 (33%); si conferma anche la rarità delle mutazioni degli altri geni noti (GLUD1, HADH e HNF4A rappresentano circa il 7%) e l'assenza di una causa nota in circa il 50% dei pazienti.

Abbiamo anche osservato una netta prevalenza delle forme diffuse su quelle focali, l'80% contro il 18%, pur tenendo presente che la diagnosi istologica è stata posta con certezza solo su 22 dei 54 pazienti. Questo rapporto tra forme diffuse e forme focali è documentato in letteratura [48], pur non essendo costante [6,54].

Le manifestazioni d'esordio più comuni sono le convulsioni [53]; l'esordio è generalmente neonatale [6], con un 61% di forme ad esordio grave e un 39% ad esordio lieve. Tuttavia abbiamo potuto verificare che i criteri utilizzati per distinguere le forme *severe* dalle forme *mild* non sono mai stati ben definiti in letteratura.

Il principale elemento di diversità della nostra casistica rispetto ai dati pubblicati [55] riguarda la risposta alla terapia medica con diazossido. Infatti il 74% dei casi controlla la patologia con il farmaco o è andato incontro a remissione spontanea e solo il 24% dei casi ha subito pancreasectomia. Questo dato ci pone degli interrogativi sul perché della migliore risposta alla terapia medica dei pazienti Italiani rispetto ad altre casistiche. Innanzitutto bisogna considerare quali siano i criteri di responsività al diazossido utilizzati. In una recente review [55] si definisce come: normalizzazione della glicemia ( $>3$  mmol/l) prima e dopo ogni pasto e durante la notte in pazienti alimentati normalmente, dopo la sospensione dell'infusione endovenosa di glucosio e di ogni altro farmaco per almeno 5 giorni consecutivi. Nel management dei nostri pazienti risulta

invece avere un ruolo cruciale nel mantenimento di una normoglicemia il supporto nutrizionale mediante un adeguato apporto di carboidrati complessi, l'uso di malto-destrine o amido di mais ed effettuando pasti frequenti. La risposta al trattamento farmacologico in una così elevata percentuale di casi potrebbe derivare da un buon management medico o probabilmente da un numero maggiore di mutazioni lievi a carico di ABCC8 e KCNJ11, ma soprattutto di mutazioni lievi di altri geni non noti nel 50% dei pazienti senza una diagnosi genetica. Infatti è tra questi che abbiamo osservato la maggior parte dei casi di forme responsive alla terapia.

Una migliore risposta al trattamento medico riduce la necessità di intervenire chirurgicamente. I nostri pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico sulla base della non responsività al trattamento e solo in alcuni di loro l'intervento è stato preceduto dal sampling venoso pancreatico e/o dalla PET per la differenziazione delle forme diffusa e focale. Questi pazienti sono poi risultati affetti da mutazioni recessive di ABCC8, nella maggior parte dei casi, o più raramente da LOH o esami diagnostici accurati e non invasivi come la PET permette di differenziare con una precisione vicina al 100% una forma focale da una forma diffusa, selezionando i pazienti e il tipo di chirurgia cui devono sottoporsi. Ciò è di notevole rilevanza clinica, infatti limitare il numero di pazienti da sottoporre a chirurgia ed evitare interventi totali o subtotali in pazienti affetti da forma focale riduce l'incidenza di complicanze metaboliche, come il diabete iatrogeno, e gastroenteriche, come l'insufficienza pancreatica e il malassorbimento.

Nella nostra casistica circa il 24% dei pazienti ha sviluppato disordini neurologici di vario grado ed entità (epilessia, ritardo psicomotorio, disordini intellettivi, comportamentali, linguistici e motori, ipotonia, ipoacusia). Di questi quasi il 54% aveva avuto un esordio neonatale e il 23% una diagnosi oltre i 12 mesi di vita. Tra i pazienti che hanno sviluppato complicanze neurologiche il 30% ha subito un intervento di pancreatectomia. In tali casi l'esordio era stato sempre neonatale e l'outcome neurologico risulta essere più grave che negli altri pazienti. Uno studio in cui sia stato valutato l'outcome neurologico di pazienti affetti da CHI (53) mostra come tali complicanze sembrano più frequenti nei casi ad esordio neonatale, in quelli in cui la diagnosi sia stata posta tardivamente e nei bambini che hanno avuto bisogno di un intervento chirurgico. Nella casistica oggetto di tale studio (53) l'incidenza globale di complicanze neurologiche risulta molto più elevata rispetto a quella osservata nella nostra, probabilmente per il minor numero di soggetti trattati farmacologicamente.

L'analisi dei dati ottenuti tramite il RICI contribuiscono a rafforzare le correlazioni genotipo-fenotipo nei pazienti affetti da CHI. Questo potrà gradualmente migliorare il management di questi pazienti. Per raggiungere questo obiettivo è tuttavia necessario che gli studi genetici e la PET diventino più largamente disponibili in modo da poter ottenere precocemente informazioni sulla genetica e il tipo istologico della patologia, ed alla luce di queste proseguire nell' iter diagnostico-terapeutico.

Nonostante la comunicazione dell'istituzione del Registro sia stata ampiamente diffusa attraverso comunicazioni telematiche, e non solo, alle strutture sanitarie e alle società scientifiche, presso tutto il territorio nazionale, i casi, pur cominciando a costituire una casistica significativa, sono ad oggi inferiori a quelli attesi.

In conclusione, auspichiamo di sensibilizzare e coinvolgere un numero sempre maggiore di centri e di specialisti che hanno in carico pazienti affetti da CHI, in modo da implementare la casistica del RICI e contribuire significativamente al progresso delle conoscenze e della gestione di questa rara e complessa malattia. Molto è ancora da fare al fine di migliorare la gestione clinica di questi pazienti e ridurre la prevalenza delle gravi complicanze cui possono andare incontro. Tra le diverse strategie che possono essere perseguite a tal fine, un ruolo cruciale sarà sicuramente svolto dai progressi nella comprensione delle basi genetiche e nell'individuazione di nuovi loci genetici e nuove mutazioni coinvolti nella CHI. Quando l'analisi genetica potrà essere eseguita di routine, queste informazioni rivestiranno un ruolo nella fase diagnostica e nella scelta dell'approccio terapeutico. Tuttavia, i benefici clinici delle conoscenze genetiche deriveranno dall'estensione dell'analisi genetica a grandi numeri di pazienti e da conseguenti studi di correlazione genotipo-fenotipo. Il progetto iniziale di ricerca delle mutazioni genetiche note nei pazienti inseriti nel Registro, proseguirà con l'applicazioni di tecniche di sequenziamento ultramassivo allo scopo di individuare nuovi loci di malattia.

## Ringraziamenti

Si ringraziano per la partecipazione al progetto di ricerca:

- Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università dell'Insubria
- Dipartimento di Pediatria, laboratorio di Endocrinologia Infantile, dell'Istituto San Raffaele di Milano
- Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Catania
- Dipartimento di scienze e tecnologie biomediche dell'Università degli Studi di Milano

Si ringrazia inoltre per i dati dei pazienti:

- G. Chiumello, S. Di Candia, P. Sogno Valin, HSR, Milano
- A. Franzese, E. Rossi, AOU Federico II Napoli
- F. Cardella, Osp. Bambini, Palermo
- F. De Luca, F. Lombardo, AOU Policlinico Messina
- S. Bernasconi, G. Chiari, AOU Maggiore, Parma
- F. Buzi, C. Prandi, AOU Spedali Civili, Brescia

e per l'analisi dei dati:

- ❖ V. Guardabasso, AOU Policlinico di Catania
- ❖ C. Ingegnosi, AOU Policlinico di Catania
- ❖ M. Crapanzano, AOU Policlinico di Catania

Un ringraziamento particolare va alla professoressa Manuela Caruso che magistralmente con dedizione, professionalità e costanza, ha creduto in questo progetto curando ogni aspetto e coordinandone i lavori.

## Bibliografia

- 1 Anysley-Green A, Polak JM, et al. Nesidioblastosis of pancreas: Definition of a syndrome and the management of the severe neonatal hyperinsulinemic hypoglycaemia. *Arch Dis Child* 1981;56: 496-508.
- 2 Dunne MJ, Cosgrove KE, Sheperd RM, Aynsley-Green A, Lindley KJ. Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev* 2004; 84 (1) : 239-75
- 3 Arnoux et al. Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2011, 6:63
- 4 Aynseley-Green A, Hall J, Saudubray JM, Nihoul-Fekete C, De Lonlay-Debeney P, Brunelle, Otonkoski T, Thornton P, Lindley KJ. Practical management of hyperinsulinism in infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2000; 82:E98-F107.
- 5 Stanley CA. Advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Nov;87(II):4857-9.
- 6 Hussain K. Diagnosis and Management of Hyperinsulinemic Hypoglycaemia of Infancy. *Horm Res* 2008; 69: 2-13
- 7 Matthew PM, Young JM, Abu OY. Persistent neonatal hyperinsulinism. *Clin Pediatr* 1988; 27:135-141.
- 8 Ramadan DG, Badawi MH, Zaki M, el Mazidi Z, Ismail EA, el Anzi IL Persistert hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (nesidioblastosis): a report from Kuwait. *Ann Trop Paediatr* 1999; 19:55-59.
- 9 Glaser B, Thornton PS, Otonkoski T, Junien C. The genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch Dis Child* 2000;82:79-86.
- 10 Otonkoski T, Ammala C, Huopio H, Cole GJ, Chapman J, Cosgrove K, Ashfield R, Huang E, Komulainen J, Ashcroft FM, Dunne MJ, Kere J, Thomas PM. A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy in Finland. *Diabetes* 1999; 48 (2): 408-415.
- 11 Bruining GJ. Recent advances in hyperinsulinism and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Curr Opin Pediatr* 1990; 2: 758-765.
- 12 Sarah E, Flanagan, PhD, Ritika R Kapoor, MRCPH, Khalid Hussain, MRCP. Genetics of congenital hyperinsulinemic hypoglycemia. *Seminars in pediatric surgery* 2011; 20: 13-17
- 13 Giurgea I, Bellané- Chantelot C, Ribeiro M, Hubert L, Sempoux C, Robert JJ, Blankenstein O, Hussain K, Brunelle F, Nihoul- Fékété C, Rahier J, Jaubert F, de Lonlay P. Molecular mechanism of neonatal hyperinsulinism. *Horm Res* 2006; 66: 289-296; 1268-1272.

- 14 Petersen OH, Findlay I. Electrophysiology of the pancreas. *Physiol Rev* 1987;67:1054-116.
- 15 Straub SG, James RFL, Dunne MJ, Sharp GWG. Glucose activates both  $K_{ATP}$  channel-dependent and  $K_{ATP}$  channel-independent signalling pathways in human islets. *Diabetes* 1998;47:758-764.
- 16 Yajima H, Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Kaneko T, Nagai M, Sharp GWG, Hashizume K. cAMP enhances insulin secretion by an action on the ATP-sensitive  $K^+$  channel-independent pathway of glucose signalling in rat pancreatic islet. *Diabetes* 1999;48:1006-112.
- 17 Melloul D, Ben-Neriah Y, Cerasi E. Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3865-3869.
- 18 Macfarlane WM, Cragg H, Docherty HM, Read ML, James RFL, Aynsley-Green A, Docherty K. Impaired expression of transcription factor IUF1 in a cell line derived from patient with persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy (nesidioblastosis). *FEBS Lett* 1997;413:304-308.
- 19 Sound NJ, Vatamaniuk MZ, Casey M, Ang SL, Magnuson MA, Stoffers DA, Matschinsky FM, Kaestner KH. Tissue-specific deletion of Foxa2 in pancreatic  $\beta$  cells results in hyperinsulinemic hypoglycaemia. *Gene Dev* 2001;15:1706-1715.
- 20 Cosgrove KE, Shepherd RM, Fernandez EM, Natarajan A, Lindley KJ, Aynsley-Green A, Dunne MJ. Genetics and pathophysiology of hyperinsulinism in infancy. *Horm Res.* 2004;61(6):270-88
- 21 Fournet JC, Mayaud C, de Lonlay P, Gross-Morand MS, Verkarre V, Castanet M, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert JJ, Nihoul-Fekete C, Saudubray JM, Junien C. Unbalanced expression of 11p15 imprinted genes in focal forms of congenital hyperinsulinism: association with a reduction to homozygosity of a mutation in ABCC8 or KCNJ11. *Am J Pathol.* 2001 Jun;158(6):2177-84.
- 22 Nestorowicz A, Glaser B, Wilson BA, Shyng SL, Nichols CG, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA. Genetic heterogeneity in familial hyperinsulinism. *Hum Mol Genet.* 1998 Jul;7(7):1119-28. Erratum in: *Hum Mol Genet* 1998 Sep;7(9):1527(23).
- 23 Thomas PM, Cote GJ, Wohlk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 1995;268:426-429.
- 24 Nestorowicz A, Wilson BA, Schoor KP, Inoue H, Glaser B, Landau H, Stanley CA, Thornton PS, Clement JP IV, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Permutt MA. Mutations in the sulfonylurea receptor gene are associated with familial hyperinsulinism in Ashkenazi Jews. *Hum Molec Genet* 1996;5:1813-1822.

- 25 Matsuo M, Trapp S, Tanizawa Y, Kioka N, Amachi T, Oka Y, Ashcroft FM, Ueda K. Functional analysis of a mutant sulfonylurea receptor, SUR1-R1420C, that is responsible for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *J Biol Chem* 2000;275:41184-41191
- 26 Thomas P, Ye Y, Lightner E. Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Molec Genet* 1996;5:1809-1812.
- 27 Nestorowicz A, Inagaki N, Gono I, Schoor KP, Wilson BA, Glaser B, Landau H, Stanley CA, et al. A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene Kir6.2 is associated with familial hyperinsulinism. *Diabetes* 1997;46:1743-1748.
- 28 Shepherd RM, Cosgrove KE, O'Brien RE, Barnes PD, Ammala C, Dunne MJ. Hyperinsulinism of infancy: towards an understanding of unregulated insulin release. European Network for Research into Hyperinsulinism in Infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000 Mar;82(2):F87-97. Review.
- 29 Kane C, Shepherd RM, Squire PE, Johnson PR, James RF, Milla PJ, Aynsley-Green A, Lindley KJ, Dunne MJ. Loss of functional  $K_{ATP}$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy. *Nat Med* 1996;2:1344-1347.
- 30 Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM, Herold KC. Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *New Eng. J. Med.* 1998;338:226-230.
- 31 Stanley CA, Lieu YK, Hsu BYL, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E, Poncz M. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *New Eng J Med* 1998;338:1352-1357.
- 32 Meissner T, Otonkoski T, Feneberg R, Beinbrech B, Apostolidou S, Sipila I, et al. Exercise-induced hypoglycaemic hyperinsulinism. *Arch Dis Child* 2001;84:254-257.
- 33 Otonkoski T, Kaminem N, Ustinov J, Lapatto R, Meissner T, Mayatepek E, et al. Physical exercise-induced hyperinsulinemic hypoglycaemia is an autosomal-dominant trait characterized by abnormal pyruvate-induced insulin release. *Diabetes* 2003;52:199-204.
- 34 Kelly A, Ng D, Ferry RJ Jr, Grimberg A, Koo-McCoy S, Thornton PS, Stanley CA. Acute insulin responses to leucine in children with the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3724-3728.



- 35 Cuesta-Munoz AL, Huopio H, Otonkoski T, Gomez-Zumaquero JM, Nato-Salonen K, Rahier J, et al. Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes* 2004;53:2164-8.
- 36 Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A, Edginton M, Hussain K, Krywawych S, Datta V, Malingre HE, Berger R, van den Berg IE. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(3):457-65.
- 37 Cosgrove KE, Shepherd RM, Fernandez EM, Natarajan A, Lindley KJ, Aynsley-Green A, Dunne MJ. Genetics and pathophysiology of hyperinsulinism in infancy. *Horm Res*. 2004;61(6):270-88.
- 38 Behram, Kliegman, Jenson. Nelson, Textbook of Pediatrics 17th edition. 38bis Meissner T, Rabl W, Mohnike K, Scholl S, Santer R, Mayatepek E. Hyperinsulinism in syndromal disorder. *Acta Paediatr* 2001;90:856-859.
- 39 De Lonlay P, Fournet JC, Touati G, Gross MS, Martin D, Sevin C, et al. Heterogeneity of persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia. A series of 175 cases. *Eur J Paediatr* 2002;161:37-48.
- 40 Dunne MJ, Kane C, Shepherd RM, Sanchez JA, James RFL, Johnson PRV, Aynsley-Green A, Lu S, Clement JP IV, Lindley KJ, Seino S, Aguilar-Bryan L. Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *New Eng J Med*, 1997;336:703-706.
- 41 Huopio H, Reimann F, Ashfield R, Komulainen J, Lenko HL, Rahier J, Vauhkonen I, Kere J, Laakso M, Ashcroft F, Otonkoski T. Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulfonylurea receptor type 1. *J Clin Invest* 2000;106: 897-906.
- 42 Suchi M, MacMullen C, Thornton PS, Ganguly A, Stanley CA, Ruchelli ED. Histopathology of congenital hyperinsulinism: retrospective study with genotype correlations. *Pediatr Dev Pathol*. 2003 Jul-Aug;6(4):322-33.
- 43 Stanley CA, Thornton PS, Ganguly A, MacMullen C, Underwood P, Bhatia P, Steinkrauss L, Wanner L, Kaye R, Ruchelli E, Suchi M, Adzick NS. Preoperative evaluation of infants with focal or diffuse congenital hyperinsulinism by intravenous acute insulin response tests and selective pancreatic arterial calcium stimulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jan;89(1):288-96.
- 44 Fournet JC, Mayaud C, de Lonlay P, Gross-Morand MS, Verkarre V, Castanet M, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert JJ, Nihoul-Fekete C, Saudubray JM, Junien C. Unbalanced expression of 11p15 imprinted genes in focal forms of congenital hyperinsulinism: association with a reduction to homozygosity of a mutation in ABCC8 or KCNJ11. *Am J Pathol*. 2001 Jun;158(6):2177-84.
- 45 Verzotti A, Fusilli P, Pallotta R, Morgese G, Chiarelli F. Hypoglycaemia in childhood: a clinical

- approach. *J Pediatr Endocr Met* 1998;11;147-152.
- 46 Fekete CN, de Lonlay P, Jaubert F, Rahier J, Brunelle F, Saudubray JM. The surgical management of congenital hyperinsulinemic hypoglycemia in infancy. *J Pediatr Surg*. 2004 Mar;39(3):267-9.
- 47 Ismail D, Hussain K. *Role of 18F-DOPA PET/CT imaging in congenital hyperinsulinism*. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11: 165-169
- 48 Pierro A, MD, PhD, Nah SA, MRCS, MS. Surgical management of congenital hyperinsulinism of infancy. *Seminars in pediatric surgery* 2011; 20: 50-53.
- 49 Huopio H, Jaaskelainen J, Komulainen J, Miettinen R, Karkkainen P, Laakso M, et al. Acute insulin response tests for the differential diagnosis of congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4502-7. 49 bis Stanley CA, Thornton PS, Ganguly A, MacMullen C, Underwood P, Bhatia P, Steinkrauss L, Wanner L, Kaye R, Ruchelli E, Suchi M, Adzick NS. Preoperative evaluation of infants with focal or diffuse congenital hyperinsulinism by intravenous acute insulin response tests and selective pancreatic arterial calcium stimulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jan;89(1):288-96.
- 50 MJ Ribeiro et al. The added value of 18Fluoro-L DOPA PET in the diagnosis of hyperinsulinism of infancy: a retrospective study involving 49 children. *Eur J Nucl Med ol Imaging* 2007. 34:2120-2128.
- 51 Smith PA, Sellers LA, Humphrey PPA. Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in MIN-6 cells. *J Physiol* 2001;532:127-142.
- 52 Mohnike K, Blankenstein O, Pfuetzner A., Potzsch S, Schober E, Steiner S, Hardy O.T., Grimberg A, Van Warde W.M. Long Term non-surgical therapy of severe persistent congenital hyperinsulinism with glucagon. *Horm Res* 2008, 70 (1) 59- 64. 52 bis Stanley CA. Advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Nov;87(11):4857-9. Review.
- 53 Menni F, de Lonlay P, Sevin C, Touati G, Peigné C, Barbier V, Nihoul- Fékété C, Saudubray JM, Robert JJ. *Neurologic outcomes of 90 neonates and infants with persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia*. *Pediatrics* 2001; 107: 476-479
- 54 C. Ingegnosi, M. Crapanzano, S. Di Candia, P. Sogno-Valin; M.C. Proverbio, C. Battaglia, I. Zamproni, S. Mora, V. Guardabasso, S. Bianca, A. Salvatoni, M. Caruso- Nicoletti. *Ipo glicemia da iperinsulinismo congenito dell'infanzia. Il registro italiano*. *G ItDiabetolMetab* 2011; 31: 88-96
- 55 Arnoux JB, de Lonlay P, Ribeiro MJ, Hussain K, Blankenstein O, Mohnike K, Valayannopoulos V, Robert JJ, Rahier J, Sempoux C, Bellanè C, Verkarre V, Aigrain Y, Jaubert F, Brunelle F, Nihoul-Fékété C. Congenital hyperinsulinism. *Early Hum Dev* 2010;





